UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

RECHERCHE D'UN SITE D'ACTION COMMUN A DIFFÉRENTES FAMILLES D'INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHÈSE

par

C. Jacques VAN ASSCHE

Soutenue le 27 Avril 1981 devant la Commission d'Examen

MM.	A. MOYSE	*Président*
	J. LAVOREL	*Rapporteur*
	J.J. HERVÉ P. JOLIOT R. MONEGER G. SCHMID	*Examinateurs*

N° d'ordre

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547321_0031

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

RECHERCHE D'UN SITE D'ACTION COMMUN A DIFFÉRENTES FAMILLES D'INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHÈSE

VOIR
ILLISIBLE
NDM

par

C. Jacques VAN ASSCHE

Soutenue le 27 Avril 1973 devant la Commission d'Examen

MM. A. KIRRMANN
J. LAVOLLAY
J.J. MOREAU
P. JOLIOT
M. MIGEON
M. RICHARD

Président
Rapporteur
Examinateur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

RECHERCHE D'UN SITE D'ACTION COMMUN A DIFFÉRENTES FAMILLES D'INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHÈSE

par

C. Jacques VAN ASSCHE

Soutenue le 27 Avril 1981 devant la Commission d'Examen

MM.	A. MOYSE	*Président*
	J. LAVOREL	*Rapporteur*
	J.J. HERVÉ P. JOLIOT R. MONEGER G. SCHMID	*Examinateurs*

N° d'ordre

UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

Pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

RECHERCHE D'UN SITE D'ACTION COMMUN A DIFFÉRENTES FAMILLES D'INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHÈSE

par

C. Jacques VAN ASSCHE

Soutenue le 27 Avril 1981 devant la Commission d'Examen

MM. A. MOYSE	Président
J. LAVOREL	Rapporteur
J.J. HERVE P. JOLIOT R. MONDESIR R. SCHMID	Examinateurs

AVANT - PROPOS

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires du Centre de Recherche de Biologie Appliquée de la Division Scientifique de la Société ROUSSEL-UCLAF ; je tiens tout particulièrement à remercier Mr. HERVE, Directeur du Département de Biologie Appliquée, d'avoir suscité et encouragé la réalisation de ce travail et d'avoir bien voulu accepter de participer à mon jury ; que Mr. NOMINE, Directeur des Recherches Agrovétérinaires et Industrielles, reçoive ici le témoignage de ma déférente reconnaissance.

Je voudrais exprimer ma respectueuse gratitude envers Mr. le Professeur MOYSE qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de son jury et qui m'a toujours prodigué ses précieux conseils.

Que Mr. LAVOREL, Directeur du Laboratoire de Photosynthèse, Gif-sur-Yvette, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'a encouragé à utiliser des méthodes dont il avait la maîtrise, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude. Je le remercie d'avoir accepté la tâche ingrate d'être le rapporteur de ce travail.

Je remercie vivement Mr. le Professeur MONEGER d'avoir bien voulu participer à mon jury.

Je voudrais exprimer ma dette de reconnaissance auprès de Mr. JOLIOT qui m'a initié avec patience aux techniques développées dans son laboratoire, où il m'a toujours réservé un accueil chaleureux. Je le remercie d'avoir bien voulu participer à mon jury.

Je tiens à remercier Mr. le Professeur SCHMID, de l'Université de BIELEFELD (R.F.A), qui lors de son séjour au C.E.N. de Cadarache, a bien voulu m'apporter un appui amical et me prodiguer de précieux conseils ; je lui suis reconnaissant d'avoir accepté, malgré sa charge de travail, de faire partie à mon jury.

Je suis redevable envers Mr. CARLES, Coordinateur Scienfique au Centre de Recherche de Biologie Appliquée, des fructueuses discussions qu'il a toujours entretenues et pour son appui scientifique dans le domaine de la chimie quantique et de l'information dans lesquels il a bien voulu apporter sa fructueuse collaboration.

Je tiens tout particulièrement à adresser à Mme REINIER, Chef du Service de Biochimie, mes vifs remerciements pour son appui compétent et l'esprit constructif dont elle a toujours fait preuve. Que soit remercié ici Mr. FAURE, du même Service, pour sa compétence technique.

Que Mme FINELLO, qui a eu la tâche ingrate de préparer ce manuscrit, trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Au cours de ce travail, j'ai bénéficié de fructueuses discussions avec MM. les Professeurs MORELAND (Université de Caroline du Nord) et ARNTZEN (Université d'Illinois) qui m'ont encouragé utilement : je leur exprime toute ma respectueuse et amicale reconnaissance.

ABRÉVIATIONS

A	Pool d'accepteurs d'électrons assurant la liaison entre le PS II et le PS I
A_{max}	Aire totale de complémentarité normalisée à ϕmax
A_t	Aires de complémentarité cumulées et normalisées à la ϕmax, pour chaque intervalle de temps t
B (ou R)	Accepteur secondaire d'électrons du PS II
Chl	Chlorophylle
CMU	N(chlorométhyle) N'N'-diméthylurée
Cyt	Cytochromes
Δ_I	Variation du plateau transitoire de fluorescence
DAD	Diaminodurène
DCMU	N (dichlorophényle)-N',N'-diméthylurée
DCPIP	Dichlorophénolindophénol
EDTA	Acide éthylènediaminetetraacétique
Fd	Ferredoxine
FRS	Ferredoxin Reducing Substance
FMN	Flavine mononucléotide
ϕ_0	Fluorescence initiale
ϕ_v	Fluorescence variable
ϕmax	Fluorescence maximale
HA	Hydroxylamine
ORF	Oxygen Reducing Factor
P_{680}	Forme spéciale de la chlorophylle-centre du PS II
P_{700}	Forme spéciale de la chlorophylle-centre du PS I
P_i	Phosphate minéral

pI_{50}	Cologarithme de la concentration produisant 50 % d'inhibition (de la réaction de Hill, des phosphorylations, etc ...)
$p\Delta A_{max_{50}}$	Cologarithme de la concentration produisant une diminution de 50 % de la taille des A_{max} (chloroplastes)
$p\phi_{v_{50}}$	Cologarithme de la concentration produisant 50 % d'augmentation du niveau du plateau transitoire de fluorescence I
$p\ \phi max_{50}$	Cologarithme de la concentration produisant 50 % de stimulation de la ϕmax (chlorelles)
$p\ L_{i_{50}}$	Cologarithme de la concentration produisant 50 % d'augmentation du pic initial de luminescence noire L_i
$p\ \Sigma L_{50}$	Cologarithme de la concentration produisant 50 % d'augmentation de l'intégrale de luminescence ΣL
$p\ SA_{max_{50}}$	Cologarithme de la concentration produisant 50 % d'augmentation de la taille des A_{max} (chlorelles)
$p\ S\phi_{O_{50}}$	Cologarithme de la concentration produisant 50 % d'augmentation du niveau de fluorescence initiale ϕ_O
PMS	N-méthylphénazium methosulfate
PQ	Plastoquinone
PS I, PS II	Photosystèmes I et II
Q	Accepteur primaire d'électrons du PS II. Q provient du terme anglais "quencher" qui sera utilisé dans le texte de préférence à sa traduction "extincteur"
$s \ldots s_4$	Etats redox d'un système de transporteurs permettant le stockage de 4 charges positives nécessaires à la libération d'une molécule d'O_2
$S_i\ M_o$	Acide silicomolybdique
SDS	Sodium Dodecylsulfate
TCA	Acide trichloracétique
TMPD	N N N' N' tétraphénylamino-diamine
Tris	Tris (hydroxyméthyle) amino-méthane
X	Accepteur primaire d'électrons du PS I
Z	Donneur primaire d'électrons au PS II

SOMMAIRE

- INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

- PREMIERE PARTIE - INHIBITION DES PHOTOREACTIONS

Chapitre I : LES INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHESE

1. Les inhibiteurs de la réaction de Hill 9
2. Les inhibiteurs des processus photochimiques : recherche d'une classification 21
3. Les inhibiteurs étudiés 35

Chapitre II : MESURE DES REACTIONS PHOTOCHIMIQUES

1. Mesure de la réaction de Hill basale 41
2. Mesure du transport d'électrons couplé à la phosphorylation non cyclique 56
3. Mesure de la phosphorylation cyclique 61
4. Mesure du transport d'électrons et de la phosphorylation en présence d'un donneur d'électrons au PS I ($DCPIP_{red} \longrightarrow NADP^+$) 63
5. Discussion et Conclusions 66

- DEUXIEME PARTIE

MISE EN EVIDENCE D'UN SITE D'ACTION COMMUN A CERTAINS INHIBITEURS DE REACTIONS PHOTOCHIMIQUES 69

Chapitre I : Mesures d'induction de fluorescence de la chlorophylle a en présence d'inhibiteurs de photosynthèse 71

1. Introduction 73
2. Matériel et Méthodes 75
3. Résultats et Discussion 80

3.1. - Chlorelles

3.1.1. Comparaison qualitative des divers inhibiteurs sur l'induction de fluorescence 80

3.1.2. Recherche d'une relation dose-effet entre concentration en inhibiteurs et certains paramètres cinétiques de fluorescence 85

3.2. - Chloroplastes

3.2.1. Comparaison qualitative des divers inhibiteurs sur l'induction de fluorescence 104

3.2.2. Recherche d'une relation quantitative entre la concentration en inhibiteur de "type-DCMU" et un paramètre lié à l'induction de fluorescence 107

3.3. - Comparaison entre Chlorelles et Chloroplastes

3.3.1. Recherche d'une hypothèse commune de la signification des aires de complémentarité normalisées à la fluorescence maximale 119

3.3.2. Cinétiques d'accumulation de l'aire de complémentarité normalisée à la ϕ max ; recherche d'un modèle explicatif utilisant des méthodes d'étude par mécanique quantique de la PQ 121

3.4. - Essai de mesure de la taille relative des pools de Q et de A sur chloroplastes 135

4. Conclusion 139

Chapitre II : Mesure du niveau initial de fluorescence sur les chloroplastes traités à l'hydroxylamine 143

1. Introduction 145

2. Matériel et Méthodes 147

3. Résultats et Discussion 147

Chapitre III : Déclenchement de luminescence par les inhibiteurs de photosynthèse chez *Chlorella pyrenoïdosa* ; possibilité de dualité d'effet de l'ioxynil 155

1. Introduction 157

2. Matériel et Méthode 159

3. Résultats et Discussions 161

3.1. - Effet qualitatif des inhibiteurs seuls 161

3.2. - Déclenchement simple ou double de luminescence noire par H_2O_2 et les inhibiteurs 163

3.3. - Relation quantitative entre la concentration en inhibiteurs et l'amplitude de la luminescence noire 165

3.4. - Cas de l'ioxynil 171

Chapitre IV : Action des inhibiteurs de photosynthèse sur les variations d'absorptions à 519 nm induites par un éclair actinique 181

1. Introduction 183

2. Matériel et Méthodes 186

3. Résultats et Discussion 191

Chapitre V : Etudes de compétition entre les inhibiteurs de photosynthèse 195

1. Introduction 197

2. Matériel et Méthodes 199

3. Résultats et Discussion 201

Chapitre VI : Perte de sensibilité des chloroplastes traités à la trypsine, aux inhibiteurs de "type-DCMU" 207

1. Introduction 209

2. Matériel et Méthodes 209

3. Résultats et Discussion 211

- CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le problème de l'intéraction inhibiteur-cible 217

- BIBLIOGRAPHIE 229

RECHERCHE D'UN SITE D'ACTION COMMUN À DIFFÉRENTES FAMILLES D'INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHÈSE

INTRODUCTION GENERALE

L'emploi des désherbants chimiques semble à première vue une acquisition récente, quelques décades tout au plus. Cependant, il est possible de retrouver, à côté du désherbage manuel mentionné par THEOPHRASTE, XENOPHON, PLINE L'ANCIEN ou VIRGILE, les premières exemples connus d'un désherbage chimique effectué à des fins agricoles dans PLINE, COLUMELLA, PALLADIUS et le "GEOPONIKA". Les extraits de cigüe dans lesquels des graines de lupins avaient été laissées à tremper étaient alors utilisés en vue de contrôler des mauvaises herbes.

Il faut attendre le XIXème siècle pour réellement voir apparaître un contrôle chimique de certaines mauvaises herbes : ce mérite revient à un viticulteur français M. BONNET, qui observa en 1896 que la bouillie bordelaise pouvait être toxique envers la moutarde, *Sinapis arvense*.
Les étapes importantes suivantes ont été l'introduction en 1932 du premier produit organique de synthèse le *2-méthyl 4,6 dinitrophénol* (DNOC) puis vers 1940 des hormones du type 2,4-D, dans le désherbage sélectif de cultures agricoles.

Par ailleurs, il faut noter que la découverte d'effets inhibiteurs de molécules chimiques sur des processus biologiques liés à la vie et au développement des plantes, et l'observation d'un effet phytocide, ont suivi deux voies différentes, particulièrement en ce qui concerne la photosynthèse.

L'inhibition de la photosynthèse de micro-organismes par un *éthyle-N-phényle-carbamate,* le phényluréthane, a été rapportée pour la première fois en 1919 par Otto WARBURG. Toutefois, il faut attendre 1945 pour que l'action sélective et l'utilisation de N-phénylcarbamates en tant qu'herbicides soient décrites par TEMPLEMAN et SEXTON. Apparemment, sans relation avec ce qui a été découvert avec le phényluréthane, une contribution historique est apportée par BUCHA et TODD en 1951 qui proposent la *N^1-(4-chlorophényle) N N diméthylurée* ou monuron comme herbicide de nombreuses adventices annuelles ou perennes. Les deux lignes évolutives de découvertes qui viennent d'être évoquées, se rejoignent en 1956 lorsque WESSELS et VAN DER VEEN relient les observations de WARBURG à leurs propres résultats obtenus avec des phénylurées, en démontrant que ces herbicides interféraient avec le transport d'électrons "induit" par la lumière dans le chloroplaste isolé.

Avant d'exposer les problèmes liés à l'action de divers inhibiteurs sur la photosynthèse, il est nécessaire de définir succintement les éléments constitutifs de celle-ci, particulièrement ceux qui entreront dans la discussion proposée au cours de ce mémoire.

La photosynthèse est un processus particulier au règne végétal, selon lequel des hydrates de carbones sont synthétisés à partir de CO_2 et d'eau en présence de lumière que PRIESLEY avait déjà décrite au XVIIIè siècle en ces termes :

$$\textit{Fixed air + water} \xrightarrow{\textit{light, green plant}} \textit{vital air + plant nourriture}$$

.. / ..

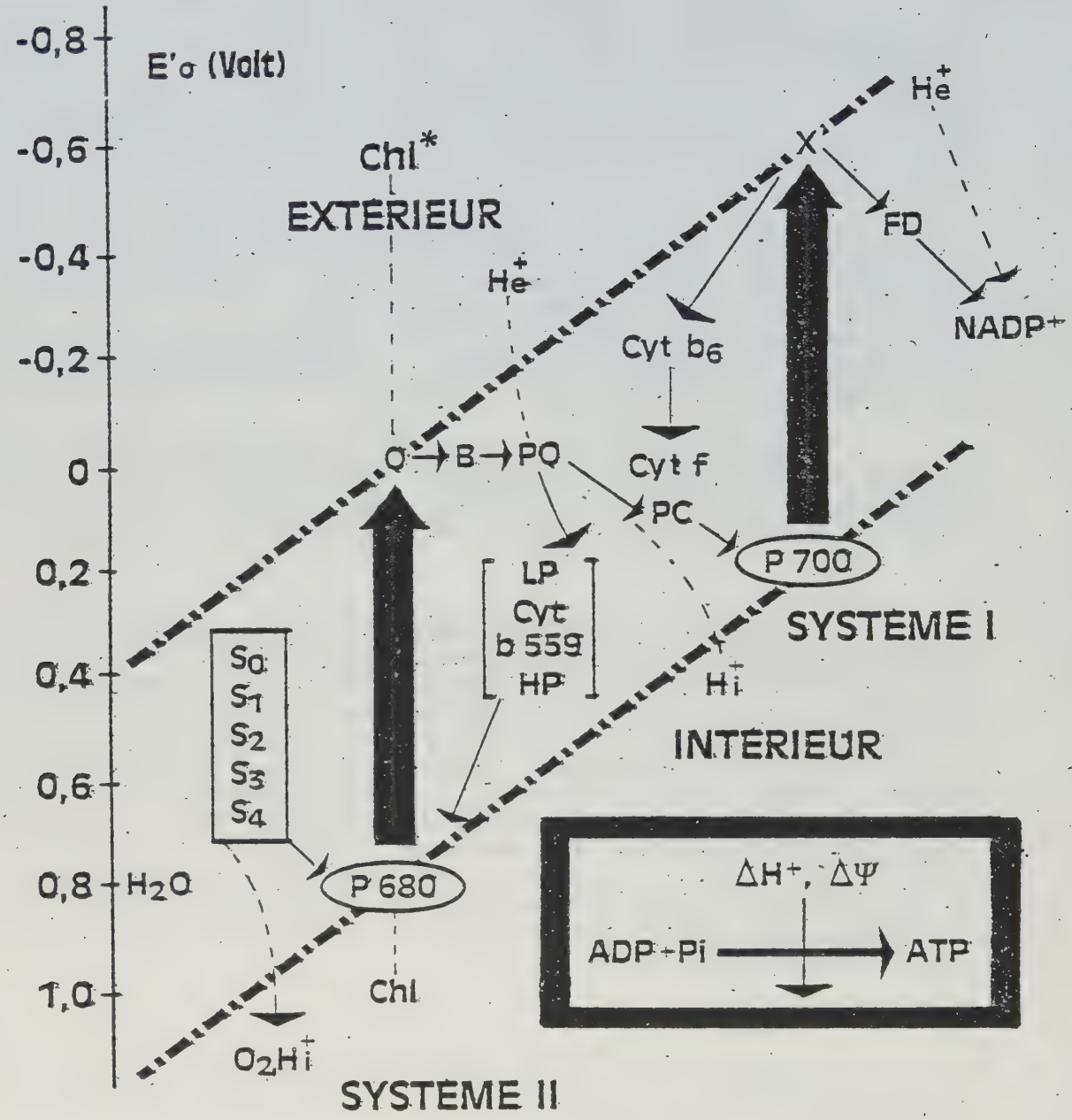


FIGURE 1 - Schéma de la photosynthèse de HILL et BENDALL (représentation de LAVOREL, 1976)

Cette équation, en langage "chimique" introduit par LAVOISIER, était reformulée de la façon suivante, par de SAUSSURE :

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\textit{lumière, plante verte}} O_2 + \textit{matière organique}$$

En termes plus modernes, la photosynthèse est représentée, sans considérations stoechiométriques, sous forme de deux équations irréversibles, chacune résumant une série complexe d'évènements :

$$H_2O + ADP + P_i + NADP^+ \longrightarrow O_2 + ATP + H^+ + NADPH \qquad (1)$$

$$CO_2 + ATP + NADPH + H^+ \longrightarrow (CH_2O) + ADP + P_i + NADP^+ \qquad (2)$$

Comme nous le verrons plus loin, tous les "inhibiteurs de photosynthèse" en général, et les herbicides en particulier, agissent sur la réaction (1).

En 1937, HILL montrait que les préparations acellulaires extraites de plantes vertes pouvaient catalyser une évolution d'oxygène dépendante de la lumière lorsqu'un accepteur d'électrons artificiel était présent. La "réaction de HILL" qui en résulte peut s'écrire :

$$2\,H_2O + A \xrightarrow{h\nu,\ \textit{chloroplastes}} 2\,A\,H_2 + O_2$$

dans laquelle A est un "réactif de HILL", ou "un accepteur de HILL".

La notion "d'inhibiteurs de la réaction de HILL" se heurte à une première imprécision, bien que les chercheurs s'intéressant aux problèmes liés au mode d'action des herbicides sur la photosynthèse se soient contentés, faute de mieux, de ce terme pendant de nombreuses années ; en effet, en utilisant uniquement cette expression, aucune référence n'est faite sur le site ou le mode d'action des inhibiteurs testés ; *toutefois, la définition formulée par TREBST (1972) est suffisamment claire pour être adoptée. Il s'agit en effet de l'évolution d'O_2 photosynthétique et la réduction d'un accepteur d'électrons par la chaine de transport photosynthétique, c'est-à-dire un transfert d'électrons induit par la lumière, dans les chloroplastes, à partir de l'eau (résultant en son oxydation en O_2) vers un accepteur d'électron exogène, artificiel ou naturel* .

Cette définition élargie permet ainsi de regrouper un grand nombre d'inhibiteurs tout en mettant en évidence la grande imprécision, relative au (x) site (s) d'action des inhibiteurs sur les photoréactions. Par suite, la première idée qui vient à l'esprit est que les inhibiteurs de la réaction de HILL peuvent ne pas agir de la même façon, ou sur le même site, à un niveau quelconque situé entre l'eau et un accepteur d'électron artificiel ou physiologique.

Une manière universellement acceptée aujourd'hui, de représenter les divers composants de la chaine de transporteurs d'électrons entre l'eau et le NADP a été proposée sous la forme du schéma de HILL et BENDALL (figure 1). Cette présentation a l'avantage de schématiser les intéractions mutuelles des différents éléments de la chaine en fonction de leur état d'oxydo-réduction,ce qui est particulièrement intéressant lorsque l'on est en présence, comme nous le verrons plus loin, d'inhibiteurs qui possèdent la propriété de changer le potentiel redox d'un ou de plusieurs de ses composants.

Le but recherché dans ce travail va consister à élucider les points suivants :

1. Préciser de la manière la plus exacte que possible, le site d'inhibition d'un certain nombre de molécules définies comme "inhibiteurs de la réaction de HILL", puis de vérifier si ces inhibiteurs possèdent un site d'action commun.

2. Après avoir acquis un certain nombre de preuves d'un site d'action commun, une recherche de caractérisation de ce site sera entreprise. Il faut remarquer que cette recherche est souvent étroitement associée à celles envisagées dans le point 1.

La démarche entreprise sera fondamentalement multi-méthodologique, permettant d'accumuler le plus de preuves possibles de l'existence d'une cible commune. Par ailleurs, il est apparu logique de se référer continuellement à l'inhibiteur le mieux connu et le plus largement utilisé par les photobiologistes : la *3,4-dichlorophényl, N,N-diméthyl-urée ou DCMU*.

Il est toutefois hors du propos de ce travail de montrer que s'il existe un site d'action commun à divers inhibiteurs, celui-ci soit unique, ce qui est très improbable (MORELAND, 1969). Il est en effet courant de distinguer les herbicides "mono-cibles", des herbicides "multi-cibles", les premiers rejoignant très souvent les seconds lorsque les recherches ont été suffisamment avancées ! De plus, cette distinction n'est souvent qu'un problème de concentration, une teneur trop élevée n'ayant probablement plus aucune signification physiologique. Par ailleurs, et comme conséquence logique à ce qui vient d'être dit, nous n'essaierons pas de montrer que le mode d'action étudié soit le mode d'action primaire des herbicides étudiés, c'est-à-dire celui responsable de la mort de la plante traitée : trop de controverses sont encore actuellement soulevées pour se hasarder à ce genre de spéculation. De plus, ce qui est vraisemblable et relativement bien démontré pour certains herbicides, ne l'est pas encore pour certaines molécules testées au cours de ce travail.

PREMIERE PARTIE

INHIBITION DES PHOTOREACTIONS

CHAPITRE I

LES INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHESE

CHAPITRE I

LES INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHESE

La photosynthèse étant un processus particulier au règne végétal et à certaines bactéries photosynthétiques (par exemple : les Cyanobactéries), on pouvait espérer à ce que les xénobiotiques interférant avec elle soient relativement peu toxiques envers les animaux à sang chaud, fait qui a été depuis largement constaté. Cette remarque a son importance dans la mesure où l'homme se préoccupe actuellement et d'une façon croissante, de l'impact des produits chimiques qu'il a créés, sur son environnement et son alimentation. De nos jours, plus de la moitié des herbicides utilisés dans le monde sont considérés comme des inhibiteurs de photosynthèse.

Devant la complexité des réactions photosynthétiques et le grand nombre de structures impliquées, il est nécessaire de trouver une classification des inhibiteurs. Toute systématique étant imparfaite, nous avons choisi de classer arbitrairement les inhibiteurs par familles chimiques en relation avec leur action sur la photosynthèse. Nous présenterons en premier les inhibiteurs de réaction de HILL au sens large, dont l'activité sur cette réaction a été montrée. Puis, nous tenterons une classification de ceux-ci en fonction de leurs effets sur des fonctions photosynthétiques définies avec plus de précision, en adoptant notamment des approches de reclassement proposées dans la littérature.

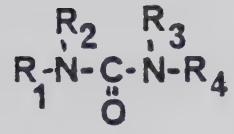
1 - LES INHIBITEURS DE LA RÉACTION DE HILL

Un certain nombre de revues bibliographiques existent sur l'influence de divers inhibiteurs sur la réaction de HILL, les plus récentes étant relatives à des interférences possibles avec des différents mécanismes mis en évidence au cours des années. Citons les mises au point de : GOOD (1961) - HILTON et al (1963) - VAN OVERBEEK (1964) - GOOD et IZAWA (1964) - AVRON (1966) - BARTH et MICHEL (1969) - CORDUAN (1970) - BUECHEL (1972) - DRABER et al (1974) - TREBST (1970 et 1974) - CORBETT (1974) - MORELAND et HILTON (1976) et IZAWA (1977) - MORELAND (1980).

Les inhibiteurs dont il sera question dans ce mémoire possèdent en règle générale des propriétés phytocides, c'est-à-dire herbicides ou algicides, à des doses d'emploi de l'ordre de quelques centaines de grammes à quelques kg par ha. Les substances nécessitant des doses massives ou celles dépourvues d'action herbicide ne seront citées que pour mémoire. Par exemple, on sait que certains insecticides, tels que parathion, ou 0,0-diéthyl-0-p-nitrophényl phosphorothionate (SUSUKI et UCHIYAMA - 1975), le DDT (BOWES et GEE - 1971) sont inhibiteurs de la réaction de HILL. De même, le fluorure de potassium possède cette propriété seulement à des pH variant de 4.8 à 5.7 (BALLANTYNE - 1972). Par ailleurs, il faut rappeler l'action de l'hydroxylamine (SHIBATA et YAKUSHNI - 1933) dont nous reparlerons plus loin, de l'orthophénanthroline (WARBURG et LUTTGENS - 1946), des polycations (BRAND et al - 1971), du chlorure mercurique (KIMIMURA et KATOH - 1972), du KCN à des concentrations élevées, supérieures à 10 mmoles (WARBURG - 1919), qui ont un effet notable sur la réaction de HILL, ainsi que les disalycilidénédiamines (TREBST et BURBA - 1967) et le pyrophosphate (FORTI et MEYER - 1969) uniquement lorsque le NADP est accepteur d'électrons. Cette liste non exhaustive montre bien la relative sensibilité de la réaction de HILL et suggère des sites d'action variés entre l'eau et le NADP. Les inhibiteurs dont l'action peut être considérée comme relativement plus spécifique sont présentés ci-après. Les structures générales des familles chimiques discutées ici sont rassemblées sur la figure 2.

STRUCTURE GENERALE

SUBSTITUTIONS

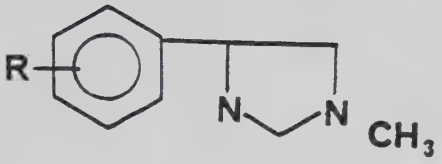


R_1 = phényle substitué, terpenoïde cyclique hétérocycles

R_2 = H, alkyle, thioalcoyle, thiophényle

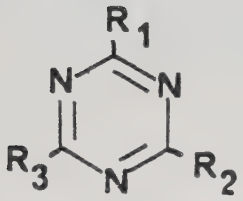
$R_3 = R_4$ = H, alkyle, thioalcoyle, thiophényle carbonylebenzoyle

UREES SUBSTITUEES



R = H, Cl

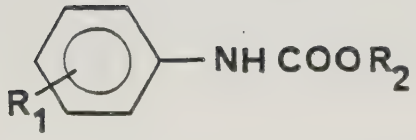
UREES CYCLISEES



R_1 = Cl, SCH_3, OCH_3, alcoyl, halogène, N_3

R_2 et R_3 = alcoylamino, cycloalcoyle

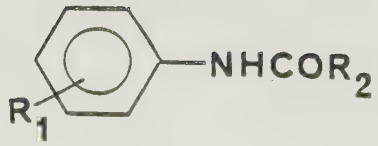
S-TRIAZINES



R_1 = alcoyles, Cl

R_2 = alcoyle, phénylcarbamate

N-PHENYLE CARBAMATES



R_1 = alcoyles, Cl

R_2 = alcoyle

N-ACYLANILIDES

FIGURE 2 - Les inhibiteurs de la réaction de Hill

A. Urées substituées

Depuis la découverte de l'activité herbicide de la famille des urées par BUCHA et TODD en 1951, WESSELS et VAN DER VEEN (1956) ont montré que 0,2 µM de DCMU causait 50 % d'inhibition de la réaction de HILL en présence de DCPIP, ainsi que l'analogue monochloré de la DCMU, le monuron. DCMU bloque également la réaction de HILL lorsque le ferricyanure est accepteur d'électrons (GOOD - 1961). Depuis cette époque, DCMU a été largement utilisée par les photobiologistes afin d'élucider les mécanismes primaires des photoréactions, tandis que des milliers d'urées substituées ont été synthétisées durant ces deux dernières décades. On note une activité optimale sur la réaction de HILL lorsque le premier azote est substitué par un phényle lui-même substitué par des halogènes (principalement Cl) ou des groupements alcoyles (CH_3 de préférence). Toutefois, la présence d'un hétérocycle en remplacement du phényle est possible : c'est le cas avec un benzothiazole ou d'un thiadiazole (TREBST et HARTH - 1974), un hexahydromethaneindène ou un norbornène (MORELAND et HILL -1963.b); la présence d'un 1,2,3-thiadiazole laisse subsister une certaine activité. Le substituant R_2 (Fig. 2) est généralement un H, mais peu porter un alcoyle (HAUSKA et al - 1975), un thioalcoyle ou un thiophényle (VAN ASSCHE - 1977). Les substitutions sur le 2ème azote sont généralement constituées par des alcoyles, thio-alcoyles, alcoxy thio-phényles (VAN ASSCHE - 1977), carbonyle benzoyle (RUZO et al - 1974) ou des radicaux cyclopropanofurane, morpholine, benzène pipéridine, phényle chloré (GOOD - 1961 , MORELAND - 1969).

Enfin, la cyclisation du groupement urée, bien que diminuant l'activité, conduit à des composés encore substantiellement inhibiteurs de la réaction de HILL (BOOTS et al - 1970, 1972).

Il serait hors de propos de faire une mise au point sur l'énorme littérature concernant l'action des phénylurées et particulièrement DCMU, sur les réactions photosynthétiques. Certaines des propriétés spécifiques de la DCMU seront discutées de façon ponctuelle au cours de ce travail.

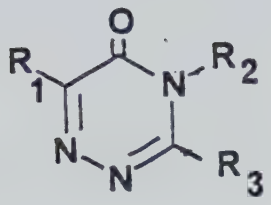
Rappelons que l'apparition récente de souches de *Senedesmus* résistantes à la DCMU (CALVAYRAC et al - 1979) peut fournir un matériel de recherche intéressant : toutefois, aucune apparition de"résitance" aux phénylurées n'a été signalée jusqu'ici sur une plante supérieure.

B. s-triazines

Depuis les premiers travaux de MORELAND et de ses collaborateurs (MORELAND et al - 1959 - 1962) et d'EXER (1958 - 1961), il est connu que la réaction de HILL est fortement inhibée par la simazine (*2 chloro-4,6-bis - éthylamino - 1,3,5, s-triazine*) et d'autres alcoylaminotriazines, sur des chloroplastes isolés (GYSIN et KNUSLI - 1960 et EXER - 1958 et 1961, MORELAND et al - 1952 - 1962, BISHOP - 1962) en présence de ferricyanure, de Vert de Janus ou autre accepteur artificiel d'électrons, ainsi que sur algues (BRAGINSKI et al - 1963, HOLLISTER et WALSH - 1973, ZWEIG et al - 1963 , WALSH - 1972).

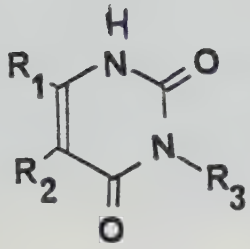
Les s-triazines les plus actives sont généralement des molécules possédant en position 2 (voir Fig. 2) un Cl, un méthylthio ou un méthoxy, en position 4 et 6 des groupements alcoylamino d'encombrement stérique relativement réduit. Cependant, on note des exceptions avec les azido-s-triazines introduites par GABBOTT et BARNSLEY (1968) et GABBOTT (1969),qui sont toutefois des *2-azido, 4,6-alcoylamino s-triazines* montrant l'importance des groupements alkylamines. Ici encore, un nombre considérable de travaux a été consacré à l'action de s-triazines sur les réactions photosynthétiques, sur la physiologie de la plante. La plupart des revues mentionnées en début de ce chapitre se réfèrent aux s-triazines, mises au point auxquelles il faut rajouter celle faite par VAN ASSCHE et EBERT (1976).

STRUCTURE GENERALE | SUBSTITUTION



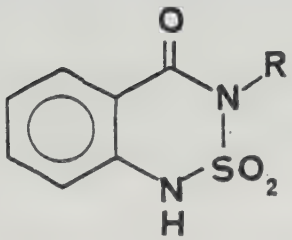
R_1 = phényle substitué, alcoyle
R_2 = alcoyle, aryle, NH_2
R_3 = alcoyle, alcoxy, thiodiazole

TRIAZINONES



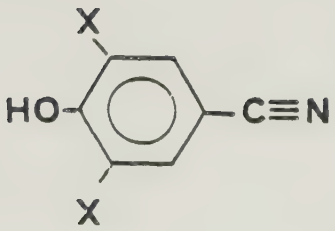
R_1 = alcoyle
R_2 = halogène, alcoyle
R_3 = alcoyle, cyclohexyle, pyranyle

URACILES



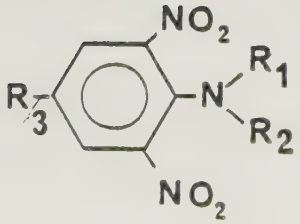
R = alcoyle

BENZOTHIADIAZINONES



X = I, Br, Cl

HYDROXYBENZONITRILES HALOGENES



R_1 = H, alcoyle, cycloalcoyle
R_2 = H, alcoyle, cycloalcoyle furanyle
R_3 = alcoyle, CF_3 SO_2 NH_2

2,4-DINITROANILINES

FIGURE 2 (suite) - Les inhibiteurs de la réaction de Hill

C - N-phénylcarbamates et *bis*-carbamates

Bien que le mode d'action primaire des N-phénylcarbamates (Fig. 2), à l'exception des *bis*-carbamates, soit probablement situé au niveau de la division cellulaire, on sait depuis les travaux déjà mentionnés de WARBURG et de WESSELS et VAN DER VEEN que ces molécules peuvent inhiber la réaction de HILL, tel que cela a été montré par MORELAND et HILL (1959), , GOOD (1961) , CAMPER et MORELAND (1965) , MORELAND (1969). Les molécules les plus actives sont en fait les *bis*-carbamates du type phendiphame (*3 Méthoxycarbonylamino phényl-N (3'-méthyle-phényle) - carbamate)* (SCHULZ 1969, TREBST et al 1968). BOOTS (1969) comparant les carbamates à leurs analogues cyclisés *(les 4 H) 3,1 benzaxoxine-2-ones)* montre que ces derniers perdent leur activité inhibitrice. Par ailleurs, les *benzyle-N-N dialcoyldithiocarbamates* ne se comportent pas comme les carbamates, en ce sens qu'ils n'inhibent pas la réaction de HILL mais bloquent la phosphorylation oxydative (WAKAMORI, 1973).

D - N-acylanilides

Les acylanilides, de structure générale présentée dans la figure 2, entrent en fait dans le groupe des phényl-amides (CAMPER et MORELAND, 1965), ce qui reviendrait à classer dans cette catégorie les N-phénylurées déjà mentionnées lorsque la substitution en R_2 est un N-alcoyle. Les mises au point mentionnées en début de ce chapitre se réfèrent largement à ce groupe de substances qui inhibent la réaction de HILL à des concentrations de 10^{-5} à 10^{-7} M (GOOD 1961, MORELAND et HILL 1962, 1963). Toutefois, le groupe d'amines du type N-halo-alcoyl-benzylanines, N-alcoyl-benzylamines, N-phénoxyalcoyle-2-propyl-amines n'ont pas été démontrés comme inhibiteurs de la réaction de HILL, malgré leur activité herbicide (SHIRAKAWA et al, 1969).

E - Triazinones

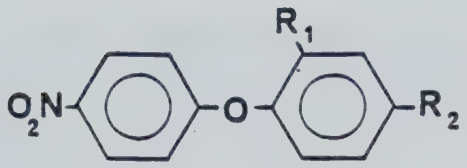
A partir de la synthèse d'une amino-triazinones par DORNOW et al en 1964, et de la découverte de ses propriétés herbicides en 1968 de diverses triazinones, il a été montré que cette famille présentait une bonne activité inhibitrice de la réaction de HILL à des concentrations variant de 10^{-5} à 10^{-7}M, notamment pour le Métribuzin ou *3 Méthyle-thio,6-tert-butyle,4-amino,1,2,4-triazine-5-one* (TREBST et WIETOSKA, 1975), et les 6-aryle-triazinones (DRABER et al, 1969 - SCHMIDT et al, 1975).

F - Uraciles

L'inhibition de la réaction de HILL par l'isocil ou *5 bromo-3-isopropyle-6-méthyle-uracile* a été découverte en 1964 par HILTON et al. Les uraciles sont en général des composés très actifs à des concentrations de l'ordre de 0,2 à 2 µM (HILTON et al 1964, HOFFMANN et al,1964) aussi bien sur chloroplastes que sur chlorelles (HOFFMANN et al, 1964). Pour obtenir cette activité, il est important de conserver le noyau uracile, et la double liaison en 5-6 (Figure 2) seuls étant substitués l'azote en 3 et les carbones 5 et 6. Il faut signaler que certains dérivés N-alcoylés possèdent la plus haute puissance inhibitrice connue envers la réaction de HILL, à une I_{50} de l'ordre de 10^{-8} M (PHILLIPS, 1978). La cyclisation sur les carbones 5 et 6 conduit également à des composés actifs. Le remplacement du carbonyle en 3 par un groupement sulfoxide donne naissance aux benzothiadiazinones (ZEIDLER et al 1969) dont un représentant, le *dioxide de 3 isopropyle-2,1,3, benzothiazine-4-one* (bentazone), est inhibiteur de la réaction de HILL (MORELAND et HILTON, 1976). Le mode d'action des uraciles a fait l'objet d'une mise au point par HOFFMANN (1972).

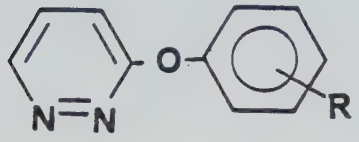
STRUCTURE GENERALE

SUBSTITUTIONS



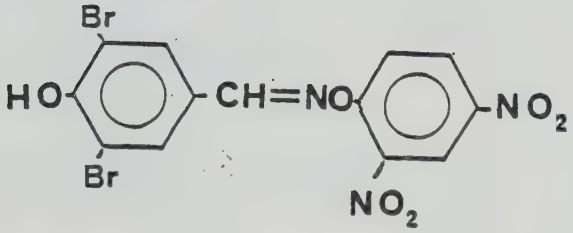
R_1 = Cl, NO_2
R_2 = Cl, CF_3

DIPHENYLETHERS



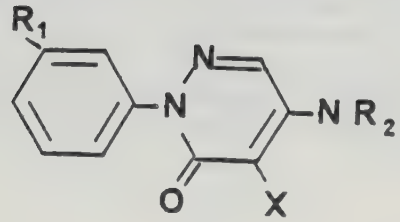
R = H, alcoyle, halogène

3-PHENOXYPYRIDAZINES



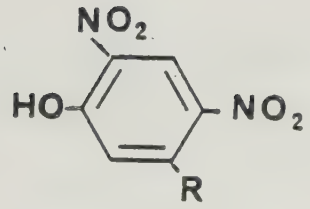
Bromofenoxime

OXIMES



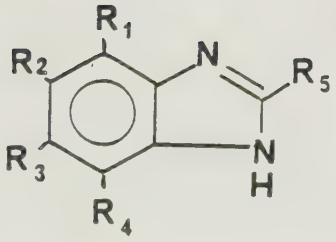
R_1 = H, CF_3
R_2 = H_2, alcoyle
X = Cl

PYRIDAZINONES



R = alcoyle

4,6-DINOTROPHENOLS



R_1, R_2, R_3, R_4 = Cl, H
R_5 = Cl, CF_3

BENZIMIDAZOLES

FIGURE 2 - (suite) : Les inhibiteurs de la réaction de Hill

G - Hydroxybenzonitriles

Les effets de benzonitriles halogénés sur la réaction de HILL ont été décrits par WAIN (1964), KERR et WAIN (1964), PATON et SMITH (1965), SMITH et al (1966). L'hydroxyle en position *para* par rapport au nitrile est indispensable à l'activité inhibitrice (Figure 2) : le *2,6-dichloro-4-hydroxy-benzonitrile* inhibe la réaction de HILL tandis que le *2,6-dichloro-benzonitrile* est inactif (MORELAND et al, 1974).

H - Ethers

Sous ce terme sont retroupés divers inhibiteurs de la réaction de HILL (Figure 2) pour lesquels cette activité à été trouvée avec les structures suivantes :

- les diphényléthers dont l'activité herbicide est liée à la lumière (MATSUNAKA, 1969 - PEREIRA et al, 1971 - KRATKY et WARREN, 1971) pour lesquelles l'inhibition de la réaction de HILL a été démontrée (MORELAND et al, 1970) ; cependant, le mode d'action primaire de ces herbicides sur la photosynthèse est mis en doute par VAN ASSCHE (1971), bien que LAMBERT et al (1979) mentionnent le terme d'inhibiteur de transfert d'énergie pour le nitrofène.

- les phénoxypyridazines, notamment la crédazine ou *3-(2-méthyl phénoxy) pyridazine* dont l'activité herbicide (TAKEMATSU et al, 1972) a été découverte sans mention de son action sur la photosynthèse, qui sera montrée dans ce travail.

- les oximes représentées par la *3,5 dibromo-4 hydroxy-benzaldéhyde O-(2,4 dinitrophényle)-oxime* ou bromofenoxime , que MORELAND et BLACKMON (1970) estiment être un produit d'addition éther d'oxime entre le bromoxynil et le 2,4 dinitro-phénol.

Toutefois, les diphényléthers au sens large ne sont pas toutes inhibitrices de la réaction de HILL, la récente classe d'herbicides dénommés "phénoxy-phénoxypropioniques" possède un mode d'action différent de la photosynthèse, ce qui montre que les substitutions sur les deux noyaux phényle produisent des variations importantes du type d'action sur la plante (TREBST et DRABER, 1979).

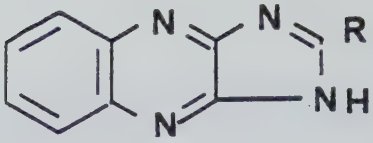
I - Dinitroanilines

Bien que ces substances soient considérées comme des poisons de mitose (SWANSON, 1972), les 2,4 dinitroanilines (voir structure Fig. 2) inhibent la réaction de HILL à des concentrations variant de 3 à 60 µMoles (MORELAND et al, 1972).

J - Pyridazinones

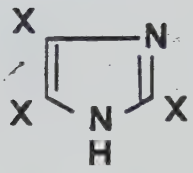
La *5 amino-4 chloro-2 phénylpyridazine-3 one* ou pyrazone (Figure 2) inhibe à 50 % la réaction de HILL à 10 µM (FRANK et SWITZER, 1969) ainsi que divers autres pyridazinones (HILTON et al)* Bien que cette famille ait été démontrée comme interférant avec la biosynthèse des caroténoïdes (BARTELS et HYDE, 1970 BARTELS et Mc CULLOUGH, 1972), l'action sur la photosynthèse semble être prédominante (HILTON et al, 1969).

*(1969)



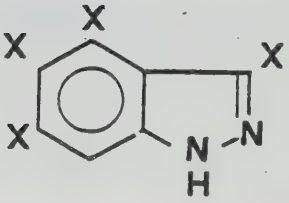
R = alcoyle

QUINOXALINE IMIDAZOLES



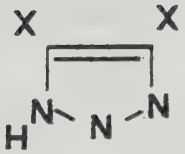
X = halogène

PYRAZOLES HALOGENES

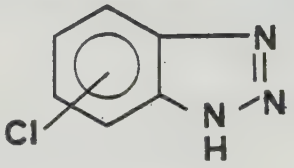


X = halogène

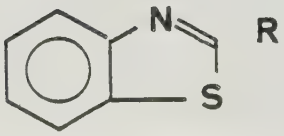
INDAZOLES HALOGENES



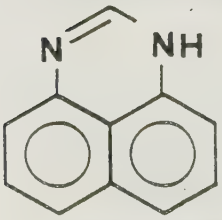
X = halogène



(BENZO)-TRIAZOLES HALOGENES



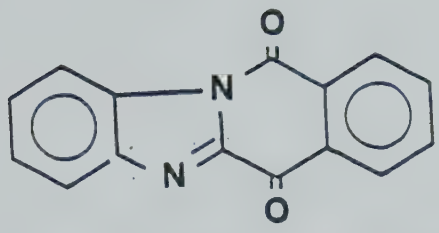
BENZOTHIAZOLES



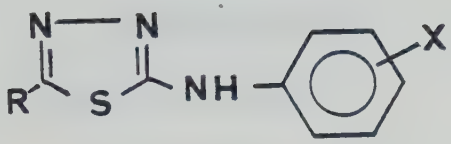
PTERIMIDINES

HETEROCYCLES DONNEURS D'ELECTRONS π

FIGURE 2 (suite) : Les inhibiteurs de la réaction de Hill



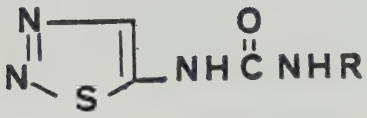
BENZIMIDAZO-ISOQUINOLINE-DIONE



$R = CF_3, C(CH_3)_3$

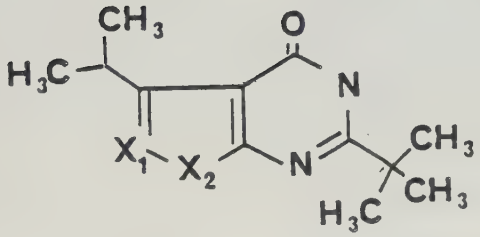
$X = Cl, NO_2, CF_3$

2-ANILINO-1,3,4-THIADIAZOLES



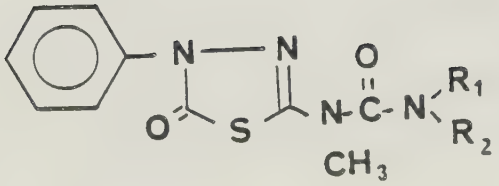
R = alcoyle, phenyle substitué

1,2,3-THIADIAZOLUREES



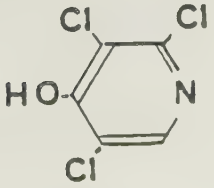
X_1-X_2 = N - O
O - N
S - N
N - S

PYRIMIDINONES



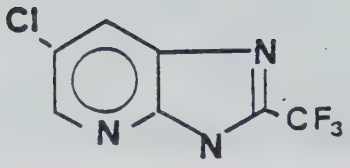
$R_1, R_2 = H - CH_3$

THIADIAZOLONE-UREES

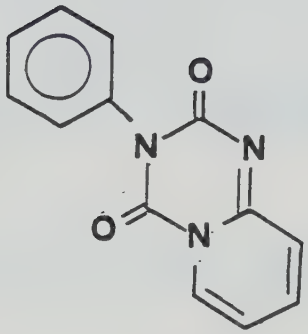


PYRICHLOR

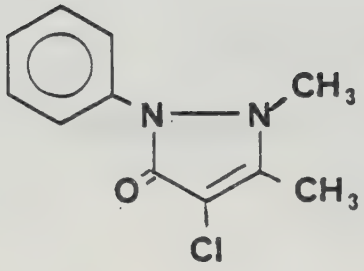
FIGURE 2 (suite) : les inhibiteurs de la réaction de Hill



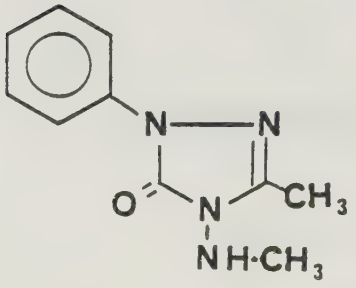
TRIFLUOROMETHYLIMIDAZOPYRIDINE



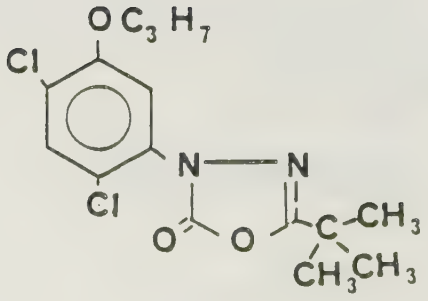
TRIAZINE-DIONES



PYRAZOLONE



TRIAZOLONE



OXADIAZOLINONE

FIGURE 2 (suite) : les inhibiteurs de la réaction de Hill

K - Dinitrophénols

Bien que les phénols en général et le *2 (sec-butyle)-4,6-dinitro-phénole* (dinosèbe) en particulier soient reconnus comme étant des découplants de photophosphorylation (WESSELS , 1959) et de phosphorylation oxydative (KANDLER , 1958), leur action inhibitrice de réaction de HILL a été démontrée (MORELAND et HILL , 1962). Il est intéressant de noter que le dinitrophénol est un élément structural de la bromofenoxime et que par ailleurs l'alcoylation en positions 3 et 6 des 4 nitrophénols halogénés conduit à des composés très actifs sur la réaction de HILL (TREBST et DRABER , 1979).

L - Structures diverses

Un certain nombre de structures sont connues en tant qu'inhibiteurs de la réaction de HILL. On y retrouve en particulier des hétérocycles non mentionnés ci-dessus dont certains sont dépourvus d'activité herbicide. Ils comprennent :

- des hétérocycles donneurs d'électrons π (voir Figure 2) : les plus connus sont les benzimidazoles (BÜCHEL et al , 1966), (BÜCHEL et DRABER , 1969) et en particulier les 2 trifluorométhyle-benzimidazoles à NH acide (BÜCHEL , 1972). Il faut y ajouter des quinaxolin-imidazoles, des pyrazoles, indazoles, triazoles, benzothiazoles, pyrimidines, indoles,

- les benzimidazo-isoquinoline-diones (REGEL et al , 1970),

- les dérivés du 2-anilino-1,3,4 thiadiazole (SCHAFER et al , 1975), du 1,2,3 thiadiazole, qui sont en fait des dérivés de phénylurées, donc pouvant être considérés comme "bi-fonctionnels" (HAUSKA et al , 1975), ainsi que des 1,2,4 thiadiazoles (BRACHA et al , 1972) et les 1,3,4-thiadiazolylurées (HATZIOS et PENNER , 1979),

- les pyrimidinones (GIBBONS et al , 1976)

- les imidazopyridines (BOND et CORBETT, 1971)

- les thiadiazolones, qui sont en fait des thiadiazolone-urées, ainsi que des triazine-diones, pyrazolones et oxadiazolinones (TREBST et HARTH , 1971),

- le pyrichlor (MEIKLE, 1970)

- les cyclopropanecarboxamides (HOPKINS et al , 1967) et les p-alcoyl-thioanilides (BARUFFINI et al , 1970) que l'on peut rattacher aux groupes déjà décrits des phénylamides et des alcoylanilides, respectivement,

- le 3 amino 1,2,4 triazole (PHUNG-NHU-HUNG,1967)

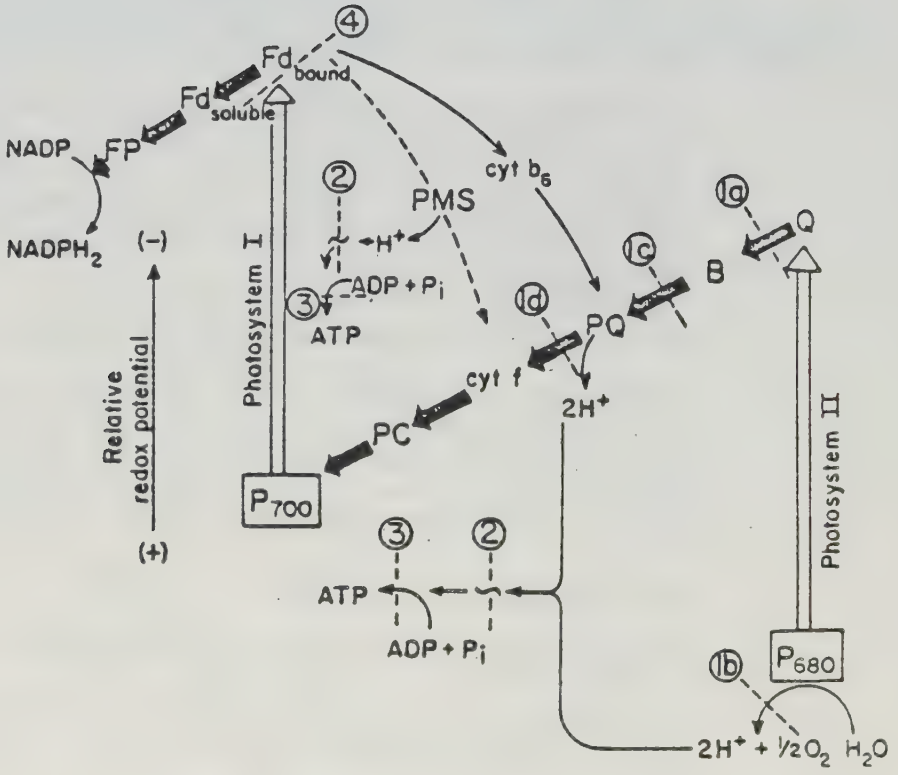


FIGURE 3 - Sites possibles d'action des inhibiteurs de photosynthèse (MORELAND - 1980)

2- INHIBITEURS DES PROCESSUS PHOTOCHIMIQUES : RECHERCHE D'UNE CLASSIFICATION

Nous avons vu que le terme *"inhibiteurs de la réaction de HILL"* reste imprécis lorsqu'une détermination d'un site d'action est recherchée. Par suite, il est utile de se référer à un type de classification rendant mieux compte des interférences connues des inhibiteurs envers les photoréactions. Une telle classification peut comporter au moins deux approches : les inhibiteurs sont classés soit en fonction de leur type d'action sur les transports d'électrons et les phosphorylations photosynthétiques (d'après MORELAND et HILTON, 1976), soit selon le site supposé d'inhibition (selon IZAWA, 1977).

2.1 - Types d'inhibitions

En se référant au schéma présenté sur la Figure 1, il est important de rappeler succintement les définitions des principaux processus liés aux photoréactions :

- Transport d'électrons et phosphorylation non cycliques :

  il s'agit du transport d'électrons entre l'eau et le $NADP^+$ ou un accepteur d'électrons d'un potentiel redox standard de l'ordre de celui de la Ferredoxine ou du NADP.
  La *"photophosphorylation non cyclique"* est définie comme étant la phosphorylation couplée au transport d'électrons non-cyclique : sa démonstration n'est plus à faire. Cependant, une certaine ambiguïté existe quant au nombre de sites de phosphorylations existants, qui sont supposés être au nombre de 2 :

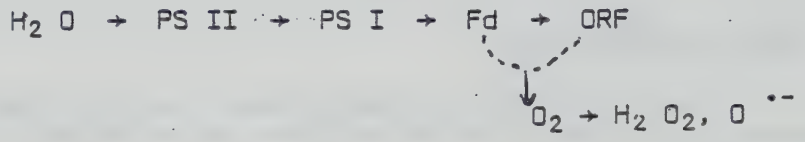
  - le premier, entre l'eau et le PS II (ORT et IZAWA, 1973, 1974 - voir également TREBST, 1974)
  - le second, entre le quencher Q et le cytochrome f (voir revues par HAUSKA, 1977 ou IZAWA, 1977)

    Toutefois, aucune indication ne permet d'identifier ce dernier à un site de phosphorylation cyclique ou non-cyclique avec O_2 comme accepteur d'électrons. En effet, MORELAND et HILTON (1976) placent ce site de phosphorylation entre Fd et le cytochrome b (Figure 3).

  En ce qui concerne le rapport P/2 e^- au cours de la photophosphorylation non-cyclique, celui-ci peut varier de 1 à 2 (TREBST et HAUSKA, 1974 , AVRON, 1977). En gardant à l'esprit que la fixation du CO_2 par le cycle de BENSON-CALVIN requiert 3 ATP pour 2 NADPH, la question reste posée de savoir quelle est la participation de la phosphorylation non-cyclique à la synthèse d'ATP utilisé dans la fixation du CO_2 : ou bien ce dernier provient entièrement de la phosphorylation non-cyclique (ATP/2 e > 1,5), ou bien une fraction supplémentaire d'ATP doit être fournie grâce au transport d'électrons cyclique ou à celui ayant l'O_2 comme accepteur (HALL, 1976). La contribution de ces dernier mécanismes serait cependant inférieure à 10 % (ROSA, 1979).Un rapport P/2 e^- serait en accord avec la présence des 2 sites de conservation d'énergie cités plus haut. Un certain nombre de méthodes (utilisation de donneurs ou d'accepteurs d'électrons, d'inhibiteurs, etc...) a permi de montrer qu'un site de phosphorylation correspondant au PS II possédait un rapport P/2^- voisin de 0,6-0,8 (ORT et IZAWA, 1974, ROSA et HALL, 1976, PAN et IZAWA, 1979), le complément étant assuré par le 2ème site de conservation d'énergie situé entre Q et cyt. f (AVRON, 1977).

- Transport d'électrons et phosphorylation non-cycliques avec O_2 comme accepteur d'électrons

Lorsque l'O_2 devient accepteur d'électrons à la place de $NADP^+$, un transport d'électrons et une phosphorylation se manifestent (réaction de MEHLER), l'eau étant donneur d'électrons selon le schéma :



Ce système, appelé improprement transport d'électrons et phosphorylation *"pseudo-cyclique"*, requiert aussi bien *in-vitro* (GROMET - ELHANAN, 1968) qu'*in-vivo* (MIGINIAC-MASLOW et MOYSE, 1969) un transport d'électrons partiellement bloqué, c'est-à-dire une situation d'équilibre redox très précise de la chaîne de transporteurs d'électrons (KAISER et URBACH, 1976).

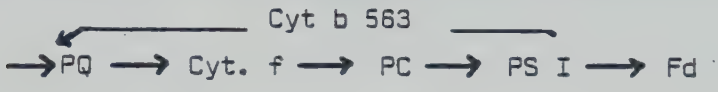
Autant la mesure d'une inhibition possible de la phosphorylation liée au transport d'électrons avec O_2 comme accepteur d'électrons est aisée, autant la détermination de ce type de photoréduction est difficile à réaliser : en effet, la photoconsommation d'O_2 liée à ce processus est masquée par le dégagement d'O_2 photosynthétique. De plus, malgré l'utilisation de méthodes permettant la mesure d'échanges gazeux, entre des chloroplastes ou des cellules entières, au spectromètre de masse et à l'aide d'O_2^{18}, d'autres mécanismes photoconsommateurs d'O_2 liés au cycle d'oxydation du carbone, à la photorespiration et à l'effet KOK ne permettent pas une mesure correcte du transport d'électrons ayant O_2 comme accepteur.

Le nombre et la localisation des sites de conservation d'énergie sont les mêmes que pour la phosphorylation non-cyclique, c'est-à-dire au nombre de deux, situés entre H_2O et PS II d'une part, PQ et le cytochrome f d'autre part (GIMMLER, 1977 - GOOD, 1977).

Le rapport P/e_2 serait de 1 à 2 (TREBST et HAUSKA, 1974) et est identique à celui de la phosphorylation non cyclique.

- Transport d'électrons et phosphorylation cycliques :

dans ce cas, l'eau ne sert plus de donneur d'électrons tandis que le $NADP^+$ n'est pas réduit ; la circulation des électrons suit probablement le chemin suivant (GIMMLER, 1977) via le PS I :



Le transfert d'électrons cyclique est sensible à l'O_2, à l'antimycine et au DBMIB (BALTSCHEFFSKY, 1975); se trouve couplée à ce transport une photophosphorylation cyclique. Celle-ci est stimulée en l'absence d'accepteurs des transports d'électrons non-cyclique et pseudo-cyclique (CO_2 , O_2) ainsi que par les découplants (TEICHLER- ZALLEN et HOCH, 1967).

Le nombre de sites de conservation d'énergie n'est pas déterminé avec certitude : TREBST et HAUSKA (1974) n'en proposent qu'un, tandis que VAN RENSEN (1971) suggère la présence de deux.

A partir des définitions qui viennent d'être fournies, il est évident que les termes "inhibiteurs de transport d'électrons non-cyclique" etc... peuvent être utilisés tels quels. En fait, MORELAND et HILTON (1976) introduisent une terminologie plus générale, rendant déjà compte du mode d'action des inhibiteurs, sans toutefois préciser le site exact d'intervention. Ces auteurs distinguent :

2.1.1. Les inhibiteurs de transport d'électrons :

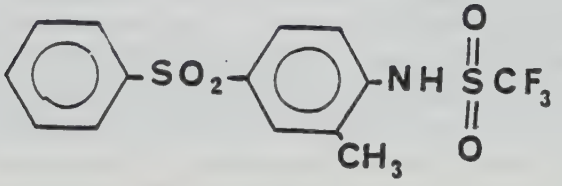
ces produits inhibent le transport d'électrons basal (conditions non-phosphorylantes), le transport d'électrons découplé par la méthylamine, et le transport d'électrons non-cyclique lorsque l'eau est donneuse d'électrons et le ferricyanure ou le $NADP^+$ sont accepteurs. Ils inhibent également la photophosphorylation couplée au transport d'électrons dans un même ordre de grandeur de concentrations que celles bloquant la photoréduction. Ces substances ont toutefois peu d'effet sur la phosphorylation cyclique. La photoréduction du $NADP^+$ en présence de donneurs d'électrons qui éliminent l'intervention de PS II (ascorbate + DCPIP, DAD) n'est pas affectée par ces inhibiteurs (MORELAND et HILTON, 1976).

Les inhibiteurs qui agissent de cette façon et qui semblent ne posséder qu'un seul site d'action sont les N-phénylurées, les *bis*-carbamates, les *s*-triazines chlorées et les uraciles substitués (MORELAND et al, 1970), les 1,2,4 triazinones (DRABERet al, 1969), les azido-triazines (GABBOTT, 1969), les cyclopropane-carboxamides (HOPKINS et al, 1967),les p-alcoyl-anilides (BELLOTTI et al, 1968) et les p-alcoyle-thio-anilides (BARUFFINI et al, 1970). Cependant, nous verrons que ces derniers méritent d'être reconsidérés avec plus de précision.

2.1.2. Les découplants :

Sans chercher à préciser dans le détail ce qu'implique le terme de découplants, tant sont variés les types d'actions rattachés à ce mode d'action, nous nous limiterons ici à présenter les produits qui dissocient la photophosphorylation du transport d'électrons. Par suite, ils inhibent la phosphorylation sans toucher au transfert d'électrons, ou plus exactement l'accélérent par la voie du contrôle photosynthétique.

En fait, la plupart des découplants connus sont peu ou pas herbicides ; c'est le cas des sels d'ammonium (KROGMAN et al, 1959), de la méthylamine (GOOD, 1960), de l'atébrine (BALTSCHEFFSKY, 1960), des carbonyle-cyano-phényle-hydrazones (HEYTLER, 1963), des antibiotiques, tels que la graminicide (AVRON et SHAVIT, 1965) , l'ionophore carboxylique A 23187 (ANDREO et VALLEJOS, 1974), la chlorpromazine (AVRON et SHAVIT, 1965) et certains phénols (GOOD et IZAWA, 1973). Le seul herbicide connu comme découplant réel à pH 8 est la *1,1,1 trifluoro 4' (phénylesulfonyl) méthane-sulfono- o-toluidide ou* perfluidone:



Elle n'inhibe pas le transport d'électrons en présence de ferricyanure, mais les photophosphorylations cyclique et non-cyclique sont inhibées (MORELAND et HILL, 1976).

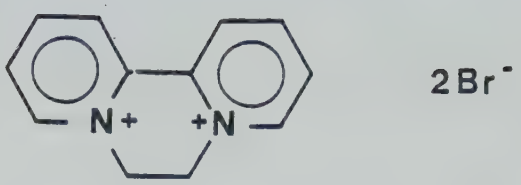
Les découplants ont fait l'objet de diverses mises au point (GOOD et al, 1966 - GOOD et IZAWA, 1973).

2.1.3 Inhibiteurs du transfert d'énergie

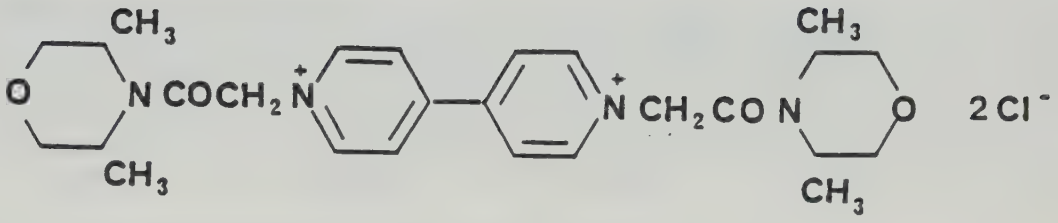
Aucun herbicide n'est connu comme étant un inhibiteur du transfert d'énergie, ce type d'action ne sera donc mentionné que pour mémoire. Durant la phosphorylation couplée au transport d'électrons, un gradient électrochimique de protons sert au couplage de la phosphorylation au flux d'électrons (MITCHELL, 1961). Les produits qui bloquent une étape terminale de la phosphorylation sans inhibition directe du transport d'électrons ou du gradient de H^+ sont appelés inhibiteurs du transfert d'énergie. Citons les mises au point de JAGENDORF (1975,1977) sur la théorie chimiosmotique de MITCHELL en relation avec la photophosphorylation, et celle de Mc CARTY (1977) sur les inhibiteurs de transfert d'énergie. Ces inhibiteurs, classés par mode d'action probable, sont :

a. Interférence avec CF_1 :

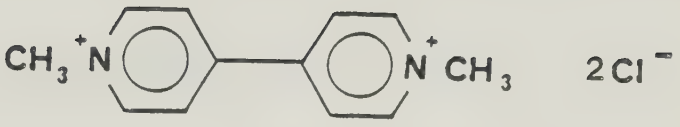
le DIO-9 (Mc CARTY et al,1965) et la phlorizine ou *4,4',6'-trihydroxy-2'-glucosidodihydro-chalcone,* ces produits interférant avec le facteur de couplage CF_1 (Mc CARTY et RACKER, 1966), ainsi qu'un réactif de "couplage" des protéines, la N-éthylmaléimide, par liaison avec le CF_1 (MAGNUSSON et Mc CARTY, 1975).



DIQUAT



MORFAMQUAT



PARAQUAT

FIGURE 4 - Accepteurs d'électrons

b. Mode d'action indéterminé :

les carbodiimides, notamment la *N-N' dicyclohexyle-carbodiimide* (DCCD) un réactif utilisé en synthèse de chimie organique, est également un inhibiteur de transfert d'énergie (Mc CARTY - 1977), auquel il faut ajouter le p.*chloro-mercuribenzoate* (IZAWA et GOOD - 1969).

NOTE - La méconnaissance du mode d'action exact des découplants et des inhibiteurs de transfert d'énergie, ainsi que l'imprécision qui entoure la connaissance du mécanisme conduisant à la synthèse de l'ATP au cours des photophosphorylations, à la lumière de la théorie chimiosmotique de MITCHELL, conduit à procéder à un choix en ce qui concerne la définition des types d'interactions de substances synthétiques sur la phosphorylation.

Rappelons que la théorie chimiosmotique repose sur les concepts fondamentaux suivants (MITCHELL, 1977) :

. Les réactions se produisent dans une membrane faiblement perméable aux protons (ou aux ions OH^-) et délimitant un espace interne constituant la structure vésiculaire du thylacoïde.

. Le flux d'équivalents réducteurs alterne entre les transports d'électrons et d'hydrogène, et vice-versa. Les réactions séquentielles doivent se produire sur les faces opposées de la membrane qui possède une géométrie particulière provenant d'un agencement spécifique des transporteurs. L'effet net permet un couplage du flux d'équivalents réducteurs au transport d'ions hydrogène de l'extérieur vers l'intérieur.

. Le flux net de protons rend l'intérieur du vésicule plus acide que l'extérieur (création d'un gradient de pH), tandis que l'intérieur devient plus électropositif. Le mouvement des protons est compensé, dans une certaine mesure, par un transport électrophore d'autres ions, la différence de flux entre H^+ et ces ions crée un potentiel électrique.

. La combinaison d'une différence de pH et la concentration en charges positives à l'intérieur du vésicule résulte en un gradient de protons représentant une activité électrochimique, qui est appelé "force protomotrice" : elle constitue la force directe conduisant à la synthèse de l'ATP et par là même, l'intermédiaire de "couplage".

. La "force protomotrice"agit via une enzyme membranaire, l'ATP-ase dont l'activité est strictement vectorielle et mène à la synthèse d'ATP.

Nous voyons qu'à partir de cette définition, l'action d'inhibiteurs sur les photophosphorylations, devient très difficile à caractériser. Par suite, nous nous adresserons à une définition "opérationnelle" des 3 termes précités, à savoir :

- Découplants :

Le "couplage"pouvant être défini comme l'association du transport d'électrons à la phosphorylation, le "découplage"implique une dissociation des deux processus : tout traitement qui permet une inhibition de la phosphorylation sans provoquer une inhibition correspondante du transport d'électrons, ou provoquer une stimulation du transport d'électrons sans être la cause d'une stimulation subséquente de la phosphorylation, doit être considéré comme "découplant" au sens large. Lorsque l'augmentation de la concentration en une substance chimique résulte en une stimulation du transport d'électrons en présence de phosphate (et dans une moindre mesure en son absence) et en une inhibition correspondante de la synthèse d'ATP, le produit en question est considéré comme découplant.

- Inhibiteurs du transport d'électrons :

Suite à la définition préalablement donnée de ce type d'inhibiteur dans le paragraphe 2.1.1. de ce chapitre, l'augmentation de la concentration en inhibiteurs du transport d'électrons a pour conséquence une inhibition du transport d'électrons en présence d'un découplant, une inhibition relativement moins importante de ce processus en présence d'ATP et de phosphate (la phosphorylation est, dans ces conditions, inhibée d'une manière similaire au transport d'électrons et est la conséquence de son blocage par l'inhibiteur).

- Inhibiteurs du transfert d'énergie :

l'augmentation de la concentration en inhibiteurs de ce type est sans effet sur le transport d'électrons, en présence d'un découplant.
Le transport d'électrons mesuré en conditions phosphorylantes est progressivement inhibé par des concentrations croissantes en inhibiteurs de ce type, tandis que la phosphorylation correspondante est plus fortement affectée. Le transport d'électrons en l'absence de phosphate est bloqué mais aucun effet de la concentration en inhibiteurs de transfert d'énergie n'est observé.

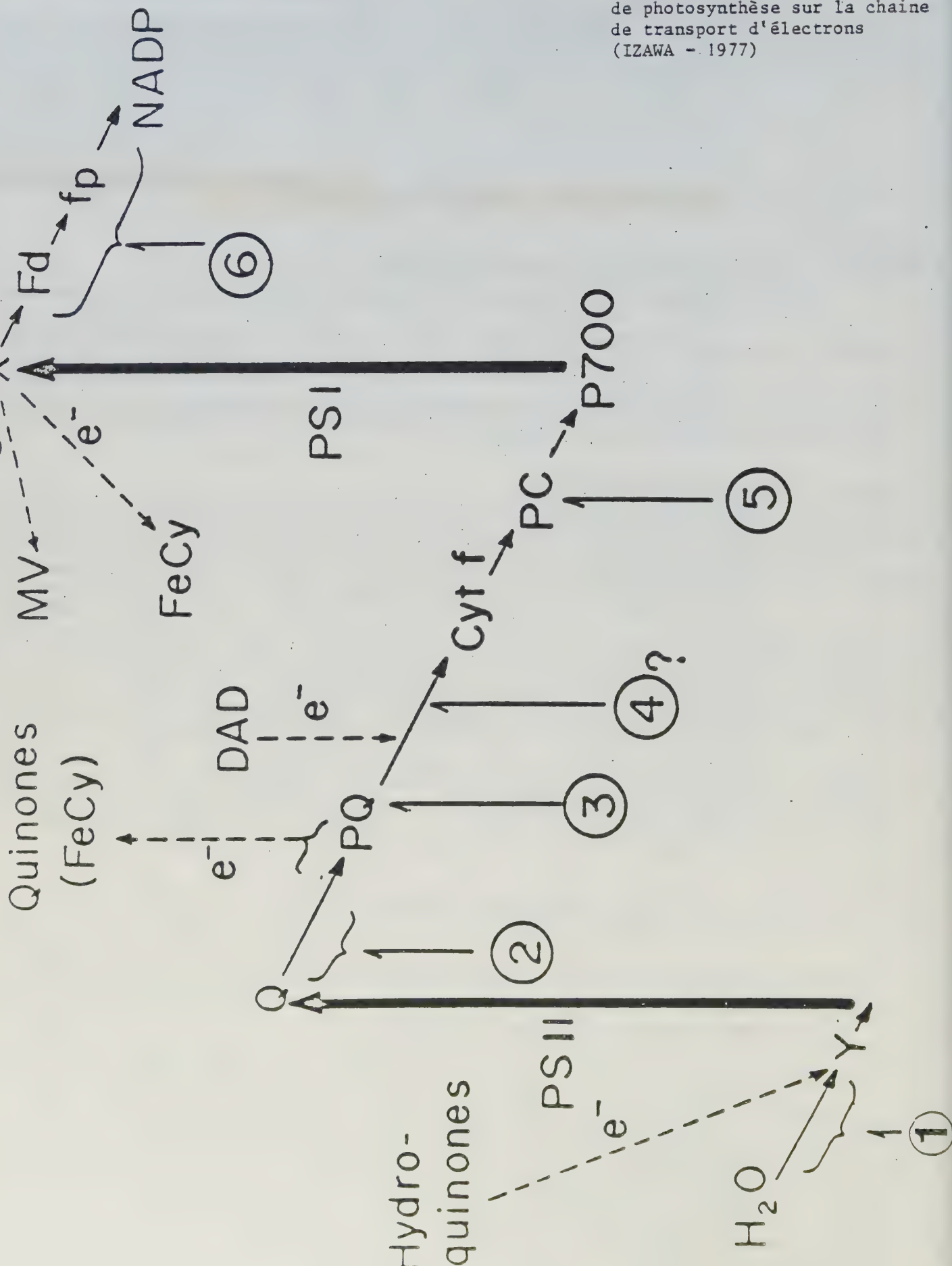
2.1.4. Inhibiteurs découplants

Les composés qui sont classés dans cette catégorie apparaissent avoir plus d'un site d'action. Les inhibiteurs découplants bloquent le transport basal d'électrons, les transports d'électrons couplé et découplé par la méthylamine, avec l'eau comme donneur d'électrons et le ferricyanure accepteur. Les photophosphorylations couplées, cyclique et non-cyclique, sont inhibées. La réduction de $NADP^+$ lorsque les électrons ne viennent par de l'eau via le PS II, par exemple en présence de DCPIP réduit, n'est pas inhibée tandis que la phosphorylation qui lui est associée est bloquée. Les effets produits par ce type d'inhibiteurs envers les réactions de phosphorylation ressemblent à ceux des découplants. Les inhibiteurs découplants, à caractère herbicide, comprennent les dinitrophénols, les hydroxybenzonitriles halogénés, les N-phényle-carbamates, les acylanilides, les imidazoles et benzimidazoles substitués (MORELAND 1967, 1969), les hétérocycles donneurs d'électrons π (BUCHEL et DRABER, 1969), la bromofenoxime (MORELAND et BLACKMON, 1970), les 2,4 dinitroanilines (MORELAND et al, 1972), le pyrichlor (MEIKLE, 1970) et les 1,2,4,thiadiazoles (BRACHA et al, 1972).

2.1.5. Les accepteurs d'électrons (site 4 - Figure 3)

Les produits classés dans cette catégorie peuvent entrer en compétition avec un constituant quelconque de la chaîne de transport d'électrons. Par suite, un certain nombre de composés redox peuvent être réduits et oxydés simultanément par une préparation de chloroplastes isolés, agissant ainsi comme médiateurs d'électrons.
On trouve parmi les accepteurs d'électrons non phytotoxiques les dérivés de la phénazine tels que la PMS (JAGENDORF et AVRON, 1958), la pyocyanine (WALKER et HILL, 1959), le FMN (ARNON et al, 1961), le DAD, le DCPIP (TREBST et PISTORIUS, 1967), le ferricyanure et les viologènes. Parmi les herbicides, ou les produits phytotoxiques, se rencontrent les quinones et particulièrement le DBMIB (BOHME et al, 1971) et les bipyridiliums. Ces derniers possèdent des potentiels redox de -300 à -500 mV et peuvent entrer en compétition avec FRS. Les plus connus sont le diquat, le paraquat (benzyl-viologène)et le morfamquant (Fig. 4).
Les bipyridiliums acceptent les électrons provenant du PS I pour former des radicaux stables (ZWEIG et AVRON, 1965) en anaérobiose. Dans la plante ces radicaux sont autooxydables et produisent ainsi de l'eau oxygénée ou de radicaux superoxydes, hautement toxiques pour les cellules, ce qui explique leur rapidité d'action (MEES, 1960). Ainsi, le diquat :

FIGURE 5 - Localisation des différents sites d'action possibles d'inhibiteurs de photosynthèse sur la chaine de transport d'électrons (IZAWA - 1977)



a) - permet les photophosphorylations cyclique et non-cyclique

b) - subit une photoréduction par les chloroplastes en anaérobiose

c) - inhibe la photoréduction de $NADP^+$, inhibition qui n'est pas levée par le DCPIP, et

d) - est réduit quantitativement par $NADPH_2$ en présence de Fd-NADP oxydoréductase, en l'absence de chloroplaste et en anaérobiose (ZWEIG et al , 1965)

Une remarque générale reste à formuler en ce qui concerne le terme "d'accepteurs d'électrons" :

Il n'est pas interdit de penser que tous les inhibiteurs de transport d'électrons puissent être des médiateurs (ou des accepteurs d'électrons) compte tenu du fait qu'ils interviennent tous dans une chaine redox, et bien que cela n'ait jamais été envisagé, semble-t-il, et encore moins prouvé.

2.2 - Localisation des sites d'actions

Si la classification qui vient d'être exposée fournit une première distinction entre les interférences possibles envers les phosphorylations et le transport d'électrons, les précisions manquent concernant le (ou) le site (s) d'action des inhibiteurs sur ce dernier. La recherche d'une localisation des herbicides étudiés ici en fonction de ce qui est déjà connu dans la littérature doit permettre de franchir une étape supplémentaire vers la connaissance la plus exacte possible du site d'action de ces inhibitions.

Un regroupement des inhibiteurs et leur localisation sur le schéma en Z de la photosynthèse est un moyen simple de visualiser une telle classification. En se reportant à la figure 3, ou à la figure 5 proposée par IZAWA (1977), cette dernière ne faisant pas apparaitre les sites d'action sur les phosphorylations, il est possible de mettre en évidence :

2.2.1 - Les inhibiteurs agissant sur la photolyse de l'eau *(site 1 b - Figure 3 ou site 1 ou Figure 5)* ou côté oxydant du PS II

L'inhibiteur le plus classique est l'*hydroxylamine* connue depuis longtemps comme inhibiteur de photosynthèse (SHIBATA et YAKUSHIJI , 1933), mais dont le mode d'action a été éclairci par JOLIOT (1966) et ses collaborateurs qui montrent, sur la base de résultats de rendement de fluorescence du PS II, que cette molécule intéragit avec le donneur primaire d'électrons du PS II, particulièrement au niveau de la photooxydation de l'eau (BENNOUN et JOLIOT, 1969). Sans insister sur la complexité de l'inhibition produite par l'hydroxylamine, action variable avec sa concentration, il semble que la destruction du système de photooxidation soit la conséquence de la libération d'un certain nombre d'atomes de Mn (CHENIAE et MARTIN , 1970), les centres traités à l'hydroxylamine étant réactivés, chez les algues, par une exposition de 20 mn à la lumière, résultant en une recombinaison de Mn (CHENIAE et MARTIN , 1972).

Le tris *(hydroxyméthyle) aminoéthane* ou *tris* est également un inhibiteur de l'oxydation de l'eau (YAMASHITA et BUTLER ,1968.a) la libération de Mn qu'accompagne le traitement (CHENIAE et MARTIN , 1970) semblant être responsable de l'inhibition. Toutefois, l'inhibition par le *tris* peut être obtenue sans perte significative de Mn puisque l'activité est restaurée en lavant les chloroplastes traités au *tris* par une solution d'ascorbate et de DCPIP réduit (YAMASHITA et al , 1971). Une telle restauration d'activité n'est pas obtenue après traitement à l'hydroxylamine (CHENIAE et MARTIN , 1972).

Parmi les autres traitements ou substances pouvant interférer avec le côté oxydant du PS II, on peut citer *l'ammoniaque* et la *méthylamine* (VERNON et ZAUGG , 1960), la *chaleur* (KATOH et SAN PIETRO , 1967), *l'irradiation UV* (YAMASHITA et BUTLER, 1968.b) et enfin certaines *phénylhydrazones* telle que la carbonylcyano-m-chlorophényl-hydrazone, dont l'effet complexe s'exerce notamment en accélérant la désactivation de l'enzyme de photolyse Y (RENGER, 1972) d'où le nom de réactifs "ADRY" *(acceleration of the deactivation of reaction Y)*. A ces composés, il faut rajouter la *5 chloro-3-terbutyle-2'-chloro-4'-nitrosalicylanilide* et l'*α-α'-bis (hexafluoro acétonyle) acétone* (RENGER , 1973).

2.2.2. Les inhibiteurs agissant entre PS II et la PQ *(site 1-a Figure 3 ou 2 - Figure 6)* ou côté réducteur du PS II

Les phénylurées, et en particulier la DCMU, ayant été étudiées de façon très approfondie en tant qu'inhibiteurs du PS II, nous mentionnerons ici ce qui caractérise ce type d'inhibition, en réservant toutefois certains aspects ponctuels pour un développement ultérieur au cours de ce travail. Les preuves accumulées, relatives à une action au niveau de PS II, se divisant en deux voies argumentaires qui sont :

2.2.2.1. Absence d'inhibition de la réaction lumineuse I

DCMU ne présente pas d'effet sur les réactions suivantes associées à PS I :

a) - Photoréduction par les algues *Scenedesmus, Phorphyridium ....*

Certaines souches adaptées à l'hydrogène peuvent fonctionner sans activité PS II en utilisant l'H_2 directement comme source d'électrons pour PS I, de sorte que bien que le CO_2 soit fixé, il n'y ait pas d'évolution d'O_2 (BISHOP ,1958). Cette observation a été interprétée pendant de nombreuses années comme étant en fait une inhibition du PS II côté oxydant par la DCMU.

b) - Réduction du NADP en présence de DCPIP plus ascorbate

lorsque le DCPIP est maintenu réduit par l'ascorbate, le NADP peut être réduit par les chloroplastes à la lumière, les électrons provenant du DCPIP réduit (VERNON et AVRON, 1965) : le PS II ne participe plus à la réduction de NADP. Dans ces conditions, DCMU demeure sans effet ; de plus, la réduction normale de NADP par des chloroplastes isolées étant bloquée par DCMU, l'activité photoréductrice est restaurée à plus de 90 % par addition de DCPIP - ascorbate dans le milieu réactionnel (VERNON et ZAUGG, 1960).

c) - Phosphorylation cyclique catalysée par la phénazine méthosulfate (PMS)

GOOD (1961) a montré que DCMU est sans effet sur la phosphorylation cyclique catalysée par PMS, cette réaction ne requiérant pas la participation de PS II.

d) - Photosynthèse en présence de lumière rouge lointain

DCMU est sans action sur cette réaction, qui met en oeuvre principalement PS I (MORELAND, 1967).

e) - Croissance et Photophosphorylation de *Rhodospirillum rubrum* (une bactérie photosynthétique) qui est dépourvue de PS II et pour laquelle seule une forte concentration de DCMU (250 µM) en freine la croissance tandis que la phosphorylation n'est pas inhibée.

2.2.2.2. Démonstration de l'action de DCMU sur ou près de PS II

Après avoir fait la démonstration d'une absence d'action par élimination, un certain nombre de preuves existent, militant pour une inhibition du PS II :

a) - Effets sur la fluorescence de la chlorophylle

Après illumination, les organismes photosynthétiques présentent une fluorescence due à la réémission de quantum lumineux provenant de la chlorophylle excitée. Depuis les travaux de DUYSENS et SWEERS (1963), il est généralement accepté qu'une substance hypothétique (Q) (quencher) "étaint" cette fluorescence en acceptant des électrons provenant de la chlorophylle énergisée par la lumière ; ZWEIG et al (1963) observèrent que les urées, notamment, stimulaient la fluorescence de la chlorophylle a II tandis que l'évolution de l'O_2 était bloquée.
DUYSENS et SWEERS expliquent cette stimulation de fluorescence non pas en termes d'une inhibition de la formation de QH par DCMU, mais par le blocage de la réoxydation de Q par le PS I, plaçant ainsi le site d'action entre Q et le cytochrome f, et excluant le PS I comme cible possible.
Une observation identique a été faite également par LAVOREL (1966) qui utilisait une technique différente d'étude la réoxydation de Q^- par une méthode d'écoulement.
Nous reviendrons plus en détail ultérieurement sur l'importance des études des effets de DCMU sur les cinétiques de fluorescence en lumière continue.

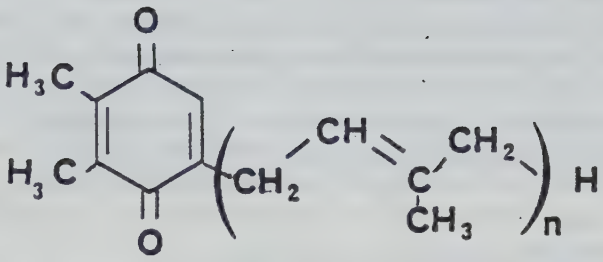
b) - La démonstration présentée dans le § 2.2.2.1, montrant que la DCMU agit avant le point après lequel DCPIP-ascorbate donne ses électrons, et le fait que la phosphorylation cyclique n'est pas inhibée, militent pour l'hypothèse d'une action localisée avant le site de couplage de la chaine de transport d'électrons et la phosphorylation.

c) - Démonstrations spectroscopiques

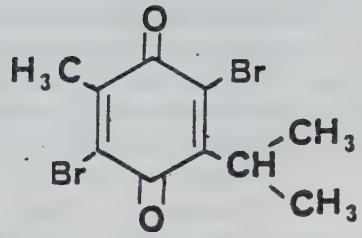
AMESZ (1964) montre que DCMU agit avant le pool de PQ par une méthode spectroscopique, tandis que WITT (1973) trouve que DCMU inhibe la décroissance à l'obscurité de X 320, un changement spectral que l'on attribue à la réduction de l'accepteur primaire d'électrons du PS II, Q (DÖRING et al, 1967).

d) - Autres preuves

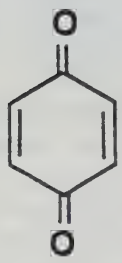
Sur la base de la théorie chimiosmotique de MITCHELL, une transition acide-base permet la synthèse d'ATP par des chloroplastes isolés (JAGENDORF et URIBE, 1966). Parallèlement, MAYNE et CLAYTON (1966) découvrent que des chloroplastes soumis à cette transition émettent un flash, qui serait dû à une séquence de "back-reactions" produisant une excitation de la chlorophylle et une réémission de lumière : DCMU à 2,5 µM inhibe cette réémission, indiquant un site d'action proche de la chlorophylle. Une autre démonstration séduisante est proposée par RIENITS et al, 1973, qui découvrirent un phénomène qui semblait représenter un retour d'électrons au PS II : il s'agit de l'augmentation du rendement de fluorescence induit par l'hydrolyse de l'ATP ; cette augmentation est supprimée par DCMU, qui suggère que les électrons endogènes n'ont pas atteint le quencher lorsque DCMU est présent.
Nous avons volontairement simplifié la présentation des expériences mettant en jeu les techniques de fluorescence qui seront développées ultérieurement (§ II). De même, certains travaux mettant en évidence l'action de DCMU sur un accepteur secondaire de PS II ont été omis, afin de les développer au cours de ce travail, et de s'en servir comme base de comparaison entre DCMU et une sélection d'inhibiteurs que nous chercherons à identifier à un mode et un site d'action du type DCMU, par une approche multiméthodologique comparative.



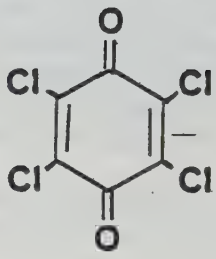
PLASTOQUINONE



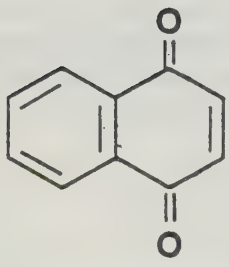
DBMIB



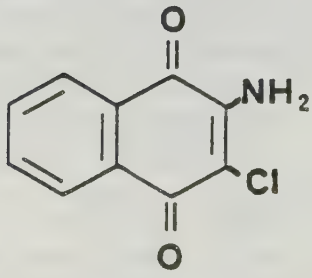
P-BENZOQUINONE



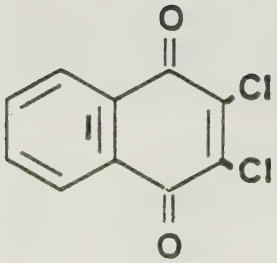
CHLORANIL



1,4-NAPHTOQUINONE



2-AMINO 3-CHLORO 1,4-NAPHTOQUINONE



DICHLONE

FIGURE 6 : BENZOQUINONES ET NAPHTOQUINONES

2.2.3. Les antagonistes de la plastoquinone *(site 1 c. Figure 3 ou site 3 Figure 5)*

Il s'agit en général de benzoquinones dont la structure est voisine celle de la PQ et qui peuvent agir par compétition avec cette dernière en interceptant les électrons provenant de PS II. La plus connue, et de loin la plus puissante, est la *2,5 dibromo-3-méthyle-6-isopropyle-p-benzoquinone* ou DBMIB introduite en 1970 par TREBST et ses collaborateurs (Figure 6). D'autres antagonistes possibles sont des isoprenyl-benzoquinones, par exemple l'helveticone et la bovinone, cependant leur activité est très inférieure à celle de la DBMIB (TREBST, 1972). Il faut noter l'absence de caractère herbicide de ces substances, qui est sans doute liée à des problèmes de pénétration dans la plante, ou de métabolisme (TREBST, 1978).

Pour mémoire, nous noterons que certaines benzoquinones sont réduites par les chloroplastes isolés, qu'accompagne un dégagement d'O_2 en quantité stoechiométrique (CHO et al, 1966), de sorte qu'elles agissent en tant qu'accepteurs classiques de la réaction de HILL. Les naphtoquinones, en général, peuvent être réduites en conditions anaérobies mais sont réoxydées à l'air ; cette autoxydabilité des naphtohydroquinones milite en faveur de l'observation faite par BLACK et MYERS (1966) de la photophosphorylation catalysée par la *2-amino 3-chloro 1,4-naphtoquinone* (Figure 6) ; 2 µM de cette substance produisent une inhibition de 50 % de la réduction de NADP. En fait, rien ne permet de classer ces molécules comme antagonistes de PQ, à l'inverse de DBMIB, mais seraient plutôt à rapprocher des accepteurs d'électrons du type bipyridilium (voir § 2.1.5) dont l'action toxique serait liée à la formation de radicaux libres (ZWEIG et al, 1969) bien que peu de preuves étayent cette hypothèse.

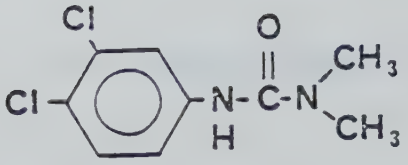
2.2.4. Inhibiteurs du transport d'électron entre la plastoquinone et le cytochrome f *(site 1 d. Figure 3 ou site 4 Figure 5)*

On a attribué l'action inhibitrice sur la réaction de HILL de carbodiimides hydrophiles, telle que la *N-éthyle-N'- (diméthyl-amino-propyle) carbodiimide* ou EDAC (Mc CARTY, 1974), à un blocage en amont du cytochrome f. Cette classification n'a encore reçu que peu de confirmations expérimentales. Les carbodiimides sont des réactifs de couplage de protéines qui, selon leur structure, et par voie de conséquence leur lipophilité ou leur hydrophilité, présentent des actions différentes qu'il semble raisonnable d'attribuer à des interférences soit avec le facteur de couplage CF_1, soit avec un site plus hydrophobe. Ce type de substance devrait donc être classé plutôt comme inhibiteur du transfert d'énergie (Mc CARTY, 1977) (voir § 2.1.3 et note page : 27). Néanmoins, les sites d'action peuvent être multiples.

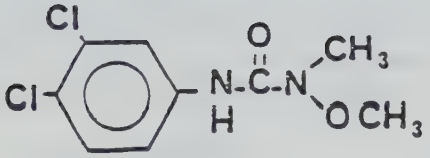
2.2.5. Inhibiteurs de la plastocyanine *(site 5 - figure 5)*

L'amphotericine B, un stéroïde complexant, rend la membrane du thylacoïde fluide autour de la plastocyanine, ce qui a pour résultat l'extrusion de cette dernière et le blocage de la réduction du méthoxy-viologène (NOLAN et BISHOP, 1975). Parmi les autres inhibiteurs de la plastocyanine, citons la *poly-L-Lysine* (BRAND et al, 1972), le *cyanure de potassium* à des concentrations supérieures à 10 mM (TREBST, 1963) et le *chlorure mercurique* (KIMIMURA et KATOH, 1972).

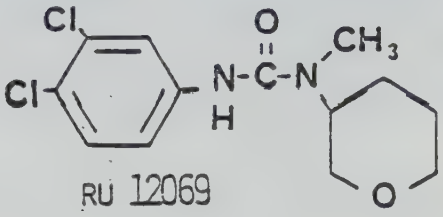
TABLEAU I



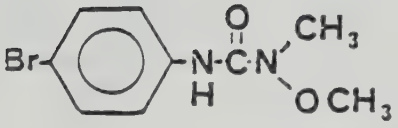
DCMU



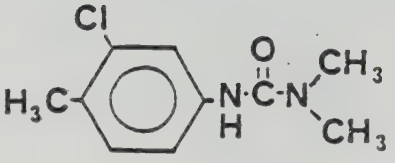
LINURON



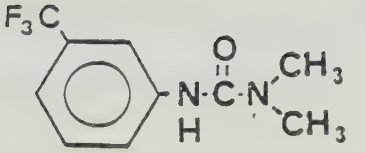
RU 12069



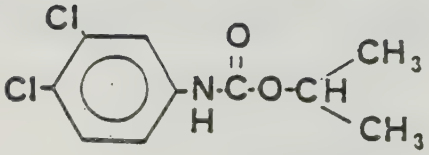
METOBROMURON



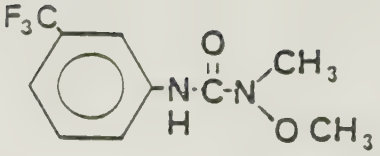
CHLORTOLURON



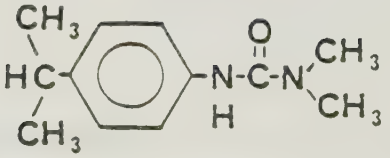
FLUOMETURON



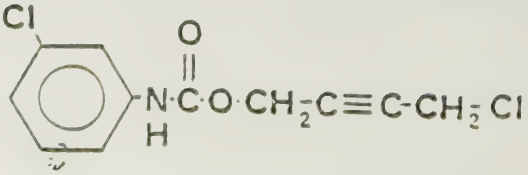
RU 22587



RU 12800



IPURON



BARBANE

3 - LES INHIBITEURS ETUDIES

L'ensemble des molécules utilisées au cours de ce travail provient de la Collection du Centre de Recherches ROUSSEL-UCLAF à Romainville. Bien que ces produits fournis soient d'une grande pureté, celle-ci est évaluée au laboratoire par chromatographie sur couche mince (SIL G - 50 UV, Macherey-Nagel Co) et le chromatogramme développé par le mélange :

- Hexane
- Acétone

} en proportions ajustées selon le produit

Les taches sont révélées par observation en lumière U.V.

Les diverses structures sont regroupées en familles chimiques, telles que définies dans le paragraphe 1 de ce chapitre, dont les formules sont présentées dans le tableau 1.

Nous utiliserons :

N-Phénylurées substituées

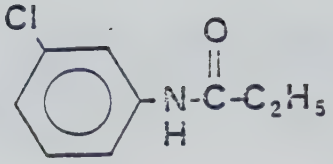
- DCMU ou diuron, ou *N-(3,4 dichlorophényle) N'N'-diméthylurée*
- Linuron ou *N (3,4-dichlorophényle) N' , N'-méthyle-méthoxyurée*
- RU 12609 ou *N (3,4-dichlorophényle) N' méthyle, N' pyranylurée*
- Métobromuron ou *N (3-bromophényle) N'méthyle N' méthoxyurée*
- Chlortoluron ou *N (3-méthyle, 4-chlorophényle) N'N' diméthylurée*
- RU 12800 ou *N (4 trifluorométhyle-phényle) N'méthyle N'méthooxyurée*
- Isoproturon ou *N (3)isopropyle)phényle) N'N' diméthylurée*
- Fluométuron ou *N-diméthyle-3(ααα trifluoro m-tolyl)-urée*

N-Phénylcarbamates

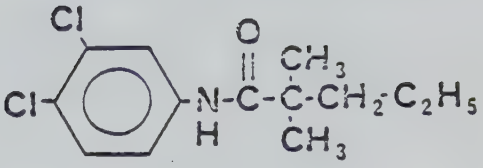
- RU 22527 ou *isopropyle-3,4 dichlorophényle carbamate*
- Barbane ou *4 chloro, 2-butynyl-m chlorocarbanilate*

N-acylanilides

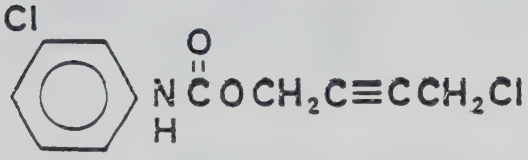
- Propanil ou 3^1, 4^1 *dichloropropianilide*
- Monalide ou *N-(4 chlorophényle) αα diméthyle-valéramide*
- Dicryl ou *N-(3,4 dichlorophényle) méthacrylamide*
- RU 21270 ou 3^1, 4^1 *dichloroisopropianilide*



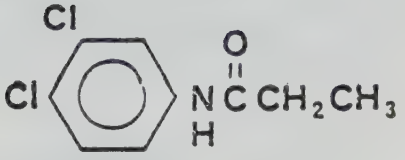
PROPANIL



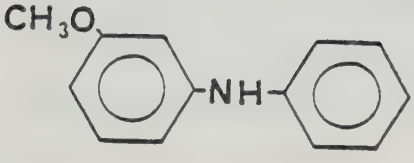
MONALIDE



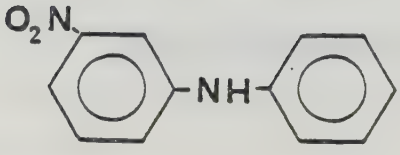
DICRYL



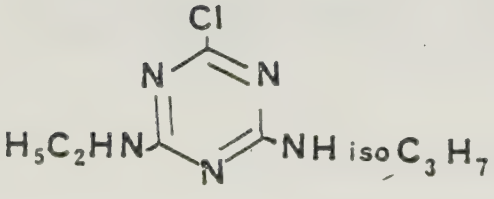
RU 21279



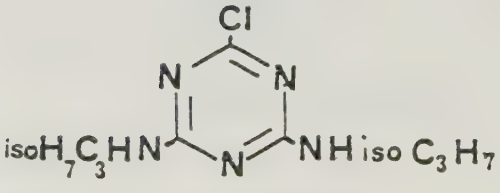
DIPHÉNYLAMINE 1



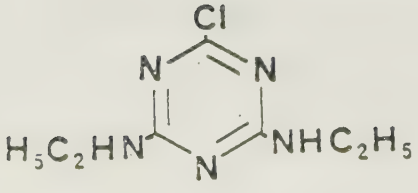
DIPHÉNYLAMINE 2



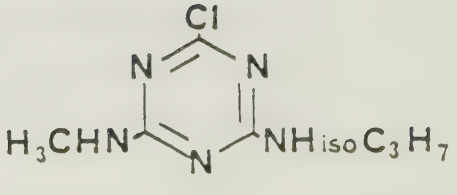
ATRAZINE



PROPAZINE



SIMAZINE



NORAZINE

TABLEAU I (suite)

s-triazines

- Atrazine ou *2 chloro, 4-isopropylamino, 6-éthylamine 1,3,5 s-triazine*
- Propazine ou *2 chloro, 4,6 bis-diisopropylamino 1,3,5 s-triazine*
- Simazine ou *2 chloro, 4,6-bis-diéthylamino-1,3,5 s-triazine*
- Norazine ou *2 chloro-, 4-isopropylamino, 6-méthyl-amino 1,3,5 s-triazine*
- RU 12259 ou *2 méthylthio, 4 éthoxy-éthoxyéthyl-amino, 6-isopropylamino 1,3,5 s-triazine*

Triazinone

- Métribuzin ou *4 amino, 6-(1,1 diméthyléthyle)-3-(méthylthio) 1,2,4 triazine-5 (4 H) one*

Hydroxybenzonitrile halogéné

- Ioxynil ou *4-hydroxy 3,5-diidobenzonitrile*

Uraciles

- Lénacile ou *3 cyclohéxyle, 5,6 triméthylène uracile*
- RU 12068 ou *3-pyranyle, 5,6 triméthylène-uracile*
- RU 12709 ou *3-pyranyle, 5 chloro 6-méthyluracile*

Urée cyclique

- RU 15086 ou *(3', 4'-dichlorophényle)-4 méthyle-imidazolidinone*

Pyridazinone

- Pyramine ou *5-amino, 4-chloro, 2-phényle, 3-(2 H) pyridazinone*

Diphényléther

- Nitrofène ou *2,4-dichlorophényl-p-nitrophényl-éther*

Phénoxypyrazine

- Crédazine ou *3-(2 méthylphénoxy) pyridazine*

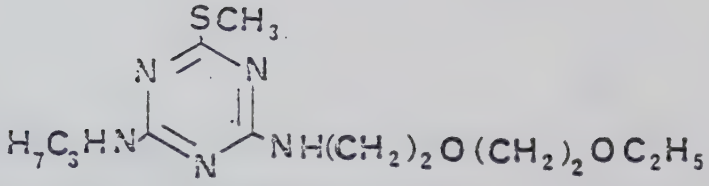
Thiadiazoles

- RU 21731 ou *2-méthylcarbamoyle - 5 n-butoxy - δ^4 1,2,4 thiadiazoline*
- RU 22827 ou *2-méthylcarbamoyle - 5 n-propyloxy - δ^4 1,2,4 thiadiazoline*

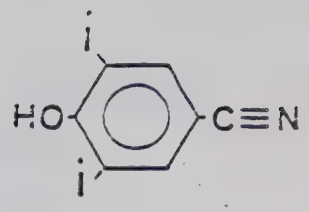
Dinitranilines

- Trifluraline ou *α,α,α, trifluoro, 2,6-dinitro, N, N, dipropyle-p-toluidine*

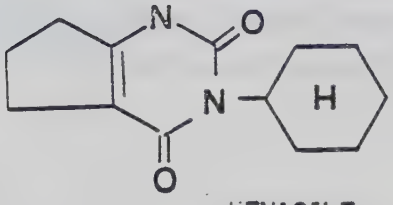
Diphénylamines



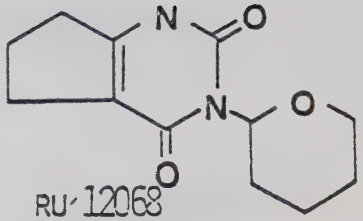
RU 12259



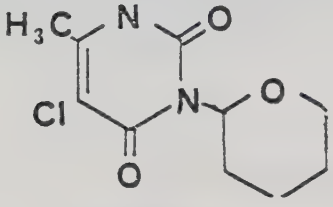
IOXYNIL



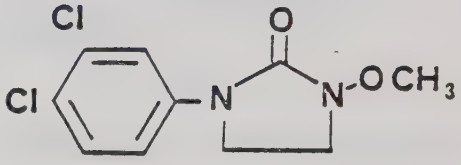
LENACILE



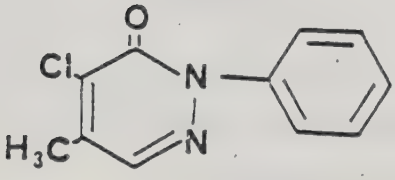
RU 12068



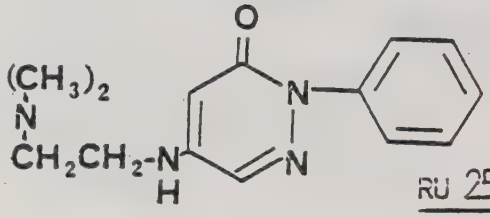
RU 12709



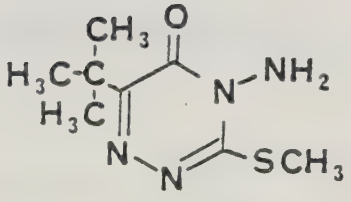
RU 15086



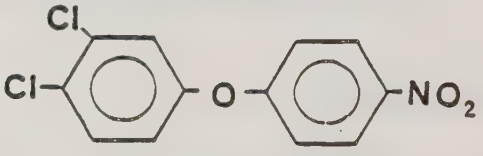
PYRAMINE



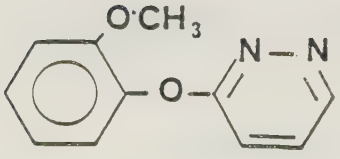
RU 2594



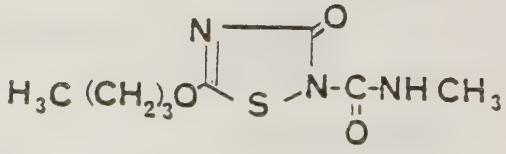
METRIBUZIN



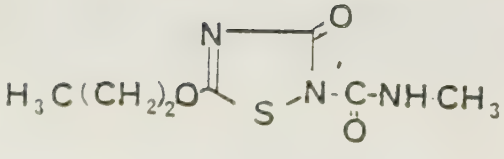
NITROFENE



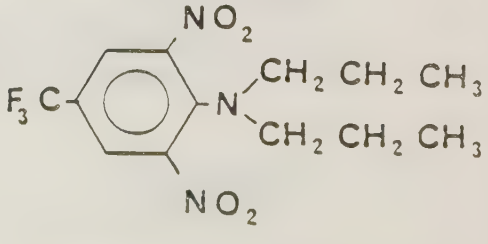
CREDAZINE



RU 21731



RU 21827



TRIFLURALINE

TABLEAU I (SUITE)

C H A P I T R E II

MESURE DES REACTIONS PHOTOCHIMIQUES

1 - MESURE DE LA REACTION DE HILL BASALE

(H_2O ⟶ Ferricyanure)

1.1. Matériel végétal

Les chloroplastes sont extraits soit d'épinards provenant du commerce, soit de feuilles de pois, soit de feuilles de tabac, élevés en chambres climatiques. Dans ce dernier cas, les plantes sont soumises aux conditions de croissance suivantes :

- Température . jour 24°C
  . nuit 17°C
- Hygrométrie ..... 76 %
- Photopériode ..... 16 h
- Eclairement correspondant à une densité de flux radiant de 125 W/m2 délivrés par des tubes fluorescents "NATURAL" (SYLVANIA)

1.2. Extraction des chloroplastes

1.2.1 Chloroplastes frais pelés

Ce type d'extraction est particulièrement utilisé lorsque les mesures de photophosphorylations sont à effectuer ; elle s'inspire essentiellement de la méthode proposée par AVRON (1960). Les feuilles sont débarrassées de leurs nervures centrales ; après lavage à l'eau courante et à l'eau distillée, les limbes sont séparés des nervures centrales. Dans le cas de l'extraction de chloroplastes à partir de feuilles de pois, celles-ci sont prélevées lorsque les plantes sont au stade 4-5 feuilles.

Toutes les opérations suivantes sont réalisées à la température du bain de glace. Les feuilles sont broyées dans un milieu constitué de NaCl 0.01 M, tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 8, saccharose 0,3 M et acide ascorbique 0.02 M, le pH étant ajusté à pH 8 - pendant 10 secondes au broyeur SORVALL, à pleine vitesse, suivi d'un 2ème broyage de 15 secondes. Le broyat est filtré sur de la toile d'étamine ou du tissu MIRACLOTH (Calbiochem), le liquide en étant exprimé par pression. Le filtrat est centrifugé pendant 2 minutes à 100 g. Le surnageant est ensuite centrifugé à 1000 g durant 5 minutes. Le culot est repris par le milieu de broyage dans lequel l'acide ascorbique a été omis. Ce culot est lavé 2 fois, puis repris dans un minimum de milieu de lavage. La teneur en chlorophylle est déterminée par la méthode d'ARNON (1949).

1.2.2 Chloroplastes congelés

Lorsque seule l'activité photoréductrice des chloroplastes doit être mesurée, sans détermination de photophosphorylation, les chloroplastes peuvent être extraits de feuilles de pois et conservés au congélateur en parties aliquotes à 30°C. Dans ces conditions, les chloroplastes sont extraits comme ci-dessus cependant le milieu de lavage et de conservation est remplacé par du saccharose 0.5 M. Les préparations sont ensuite divisées en aliquots de 0,5 à 1 ml, en fonction de l'activité spécifique des chloroplastes. Ces aliquots sont ensuite décongelés et utilisés selon les besoins. L'activité photoréductrice de cette préparation, bien que présentant une décroissance régulière en fonction du temps, reste acceptable entre 2 et 4 semaines après l'extraction.

1.2.3 Chloroplastes intacts (tabac)

Certaines mesures de fluorescence (voir chapitre I - 2ème partie) requièrent l'extraction de chloroplastes dont le degré de connexion entre les deux photosystèmes est correct. Dans ce cas, les chloroplastes intacts sont obtenus selon la technique décrite par WALKER (1965) à partir de tabac variété *John Williams Broadleaf*.
Les chloroplastes sont suspendus dans un milieu contenant du saccharose 0,4 M - du Na Cl 10 mM, du tampon Tris - HCl - pH 7,5 50 mM - de la séralbumine 0,2 % et de la pectinase à 0,2 % (HOMAN et SCHMID, 1967), ce qui assure une réduction de ferricyanure d'une activité spécifique de l'ordre de 400 µmoles de ferricyanure réduit/mg chlorophylle/heure. Afin d'assurer une bonne pénétration du ferricyanure, dans le cas de la mesure de la photoréduction de celui-ci, les chloroplastes sont débarrassés de leur enveloppe par choc osmotique après dilution dans la solution tampon d'extraction dépourvue de saccharose.

1.3 Mesure de la photoréduction du ferricyanure de potassium

1.3.3 Méthode manuelle

Le milieu réactionnel est constitué de chlorure de sodium 12 mM, de tampon Tris - HCl, pH 8,0 - 20 mM, de saccharose 0.3 M, de ferricyanure de potassium 2 mM, auquel on ajoute la préparation de chloroplastes correspondant à 120 chlorophylle/ml (cette concentration peut être modulée en fonction de l'activité photoréductrice de la préparation chloroplastique) et une solution éthanolique d'inhibiteurs à tester, de sorte que la concentration finale en éthanol ne dépasse pas 1 %. Pour tous les essais, un témoin contenant 1 % d'éthanol est comparé et sert de référence dans le calcul des taux d'inhibition.

La suspension de chloroplastes (5 ml) est placée dans un bécher de 50 ml et éclairée par le fond grâce à une lumière délivrée par une lampe MAZDA PAR-38 ; un filtre thermique à eau est placé entre la source lumineuse et le bécher. La durée et l'intensité d'éclairement sont fixés en fonction des conditions définies en 1.3.3.

A la fin de l'essai, 1 ml d'acide trichloracétique 10 % v/v est ajouté et le milieu ainsi acidifié est centrifugé à 5000 g pendant 5 minutes. La densité optique est mesurée sur le surnageant à une λ = 420 nm.

1.3.4 Méthode automatique

La mesure de la réaction de HILL, en présence de ferricyanure comme accepteur d'électrons, peut être aisément automatisée ; ainsi, un grand nombre de substances et de concentrations peuvent être testées.

1.3.4.1 Principe de fonctionnement

Fondamentalement, la méthode est une adaptation des essais manuels décrits en 1.3.3 ; cependant, compte tenu du manque de sensibilité observé dans la mesure de faibles différences entre les concentrations de ferricyanure, la réaction est basée sur la détermination colorimétrique du ferrocyanure formé par la photoréduction.

La suspension de chloroplastes, en solution tamponnée et contenant le produit à tester, est aspirée et segmentée, puis, après mélange, illuminée. La réaction est ensuite stoppée, les chloroplastes désintégrés et les protéines floculées par addition d'acide trichloroacétique. Les composés à P.M. bas (tels que le ferrocyanure) sont séparés par dialyse en continu. Le produit de dialyse est mélangé à une solution de chlorure ferrique à 0,5 %, qui est réduit stoechiométriquement par le ferrocyanure formé. Le chlorure ferreux obtenu produit à son tour un complexe orangé avec l'ortho-phénanthroline, la réaction colorée se développe pendant 5 minutes et la densité lue à 505 nm par un colorimètre à flux continu.

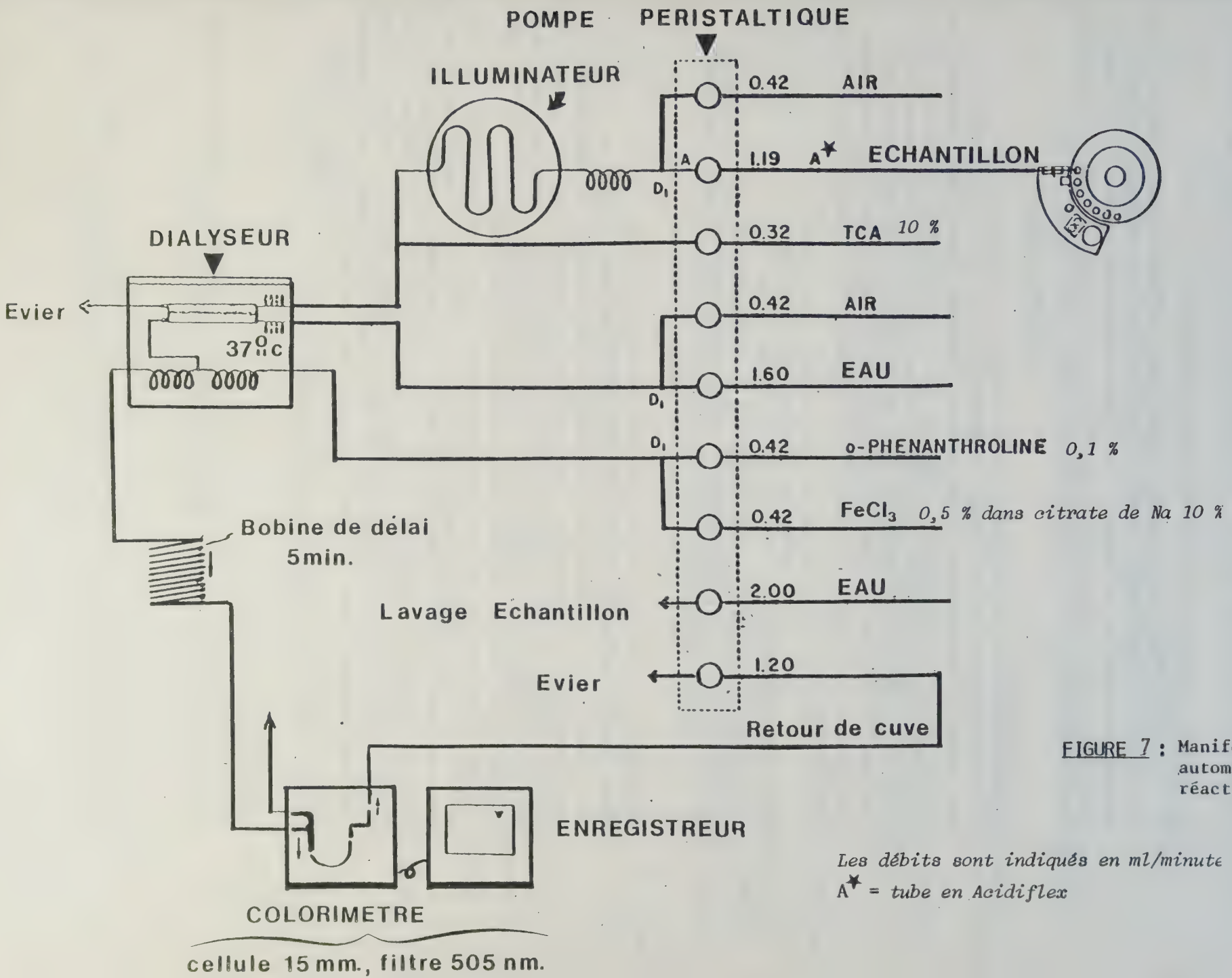


FIGURE 7 : Manifold de mesure automatisée de la réaction de HILL

Les débits sont indiqués en ml/minute

A* = *tube en Acidiflex*

1.3.4.2 Appareillage

Le système analytique est constitué d'un Auto-analyseur II Technicon, dont les modules assemblés selon le schéma présenté sur la figure 7, comprend :

a) - Un échantillonneur muni d'un agitateur vibrant :

le nombre d'échantillons est sélectionné par une came et fixé à 40 ou 50 échantillons par heure. Un bac est positionné au-dessous du plateau porteur de coupelles et rempli d'un liquide refroidi autour de 0°, les chloroplastes en suspension diluée étant relativement instables à température ambiante.

b) - Un illuminateur :

l'éclairement du flux de liquide segmenté par des bulles est assuré par une lampe à incandescence correspondant à 250 W/m2 (conditions pré-établies, voir § 1.3.3.) qui illumine un tube en verre en serpentin de 110 cm de long et 2,4 mm de diamètre intérieur, immergé dans un bain thermostaté à 25°C. La durée d'éclairement est ajustée en masquant partiellement une longueur déterminée du tube. Toutes les opérations devant être réalisées sous faible éclairement en dehors de l'illuminateur, celui-ci est entouré d'un écran.

c) - Pompe péristaltique :

qui écrase les tubes de polyéthylène ou Acidiflex "R", selon le cas, de tailles variables, ce qui permet le dosage exact des volumes à mélanger en proportions similaires à un essai manuel.

d) - Dialyseur :

après passage en milieu acide, les chloroplastes sont brisés et les protéines floculées : le ferrocyanure formé doit être extrait et séparé des résidus solides en suspension. Cette opération est réalisée par un dialyseur à flux continu, constitué de 2 plaques de Téflon dans lesquelles une gorge semi-cylindrique est creusée et dont les dessins spiralés sont placés exactement face à face et séparés par une feuille de cellophane.
L'échantillon est par suite dialysé contre de l'eau, les débits et la segmentation devant être similaires de part et d'autre de la membrane de dialyse. Dans ces conditions, les petites molécules franchissent la membrane et la solution mélangée au mélange $Fe\,Cl_3$ - *o phénanthroline*. La réaction colorimétrique est laissée à développer pendant 5 minutes dans une bobine de verre. Il faut noter que la réaction colorée entre les ions ferreux et l'*o-phénanthroline* évoluant avec le temps, l'analyse en continu constitue un moyen idéal de résoudre ce problème, le temps écoulé durant le passage entre chaque module étant rigoureusement constant.

e) - Colorimètre :

la lecture s'effectue à 505 nm, la longueur d'onde exacte étant donnée par un filtre, au travers d'une cellule à flux continu en verre.

f) - Enregistreur :

celui-ci enregistre les données du colorimètre, la vitesse de défilement peut être réglée, ainsi que l'intensité du signal d'entrée.

1.3.4.3 Réactifs

- Milieu réactionnel : identique à celui utilisé dans la méthode manuelle
- 1,10 phénanthroline 0,1 % dans l'eau contenant 0,2 % d'éthanol dans lequel le produit est solubilisé avant ajustement
- chlorure ferrique à 0,5 % (p/v) dans du citrate de sodium à 10 % (p/v)
- acide trichloroacétique à 10 % (p/v)
- eau de dialyse et de rinçage : une bonne segmentation est obtenue en ajoutant 0,5 ml de Brij. 35 (Technicon) par litre d'eau

1.3.4.4 Précautions liées à la mesure de la réaction de HILL à l'aide de l'auto-analyseur

Ces précautions comprennent la détermination de conditions optimales de mesure de la photoréduction et certains aspects particuliers à l'utilisation de l'auto-analyseur.

Dans le premier cas, les condifions à remplir étant communes aux méthodes manuelle et automatique, elles seront décrites dans le paragraphe 2.2.3. En ce qui concerne les mesures automatiques elles-mêmes, les éléments suivants doivent être considérés :

- Tout le montage allant de la prise d'échantillon jusqu'à l'illuminateur doit être réalisé en verre.
  Le tube de pompe est constitué d'un matériau appelé *Acidiflex* et les manchons de jonction entre les parties en verre sont du même matériau. En effet, tous les autres tubes disponibles dans le commerce adsorbent certains inhibiteurs et les relarguent progressivement, de sorte que les résultats sont faussés.

- Entre les séries d'échantillons contenant un inhibiteur, une coupelle remplie d'éthanol est intercalée afin de rincer les tubes de traces d'inhibiteurs adsorbés.

- Un ou plusieurs témoin (s) sans inhibiteur sont intercalés afin de détecter la présence de traces éventuelles d'inhibiteurs et de s'assurer de la bonne activité photoréductrice des chloroplastes.

- L'ensemble de l'appareil et les réactifs doivent être protégés de la lumière, ces derniers étant photosensibles.

- La segmentation par l'air doit être la plus régulière possible : elle constitue la base du succès dans l'analyse en continu.

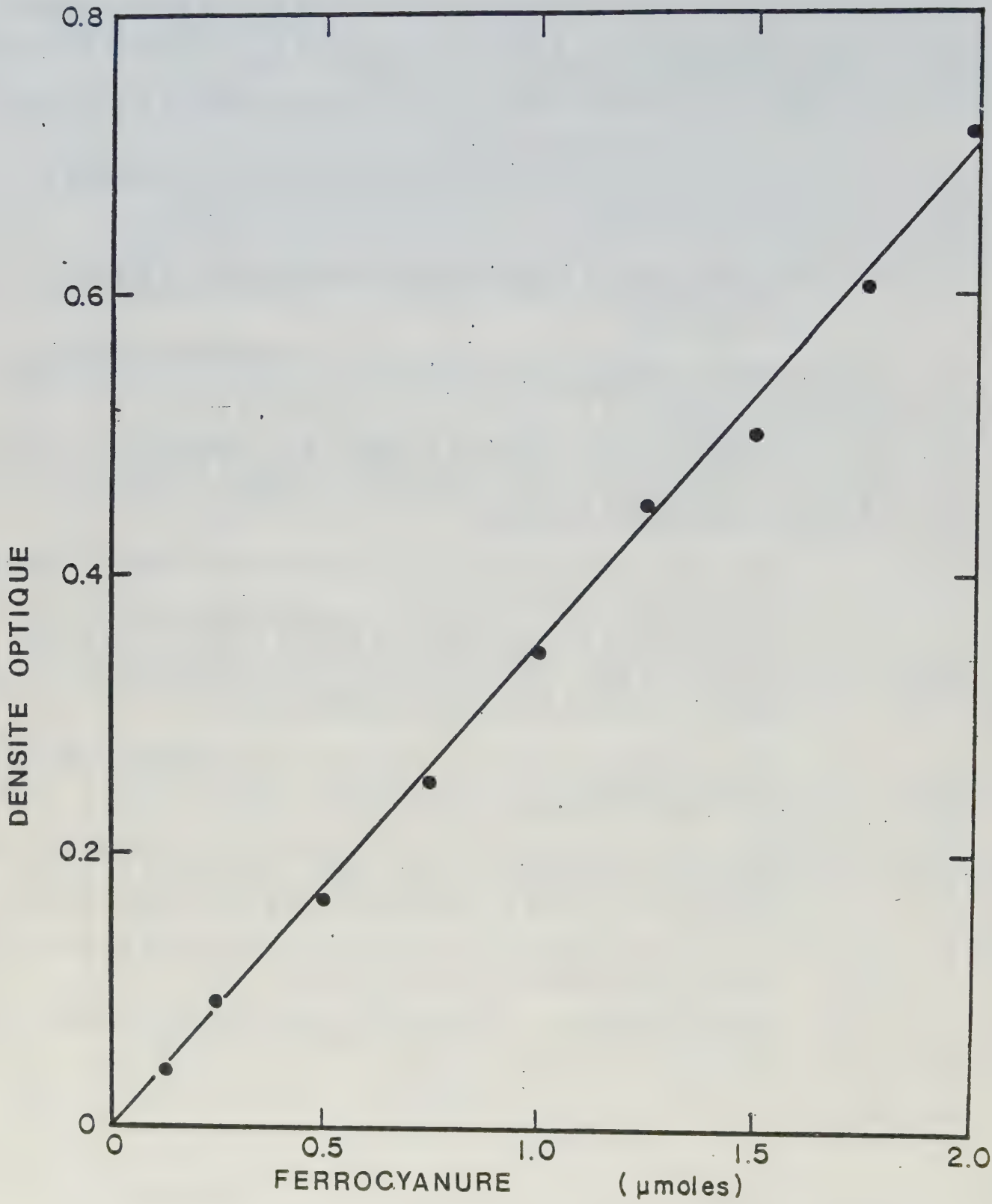


FIGURE 8 : Relation entre la concentration en ferrocyanure et la densité optique

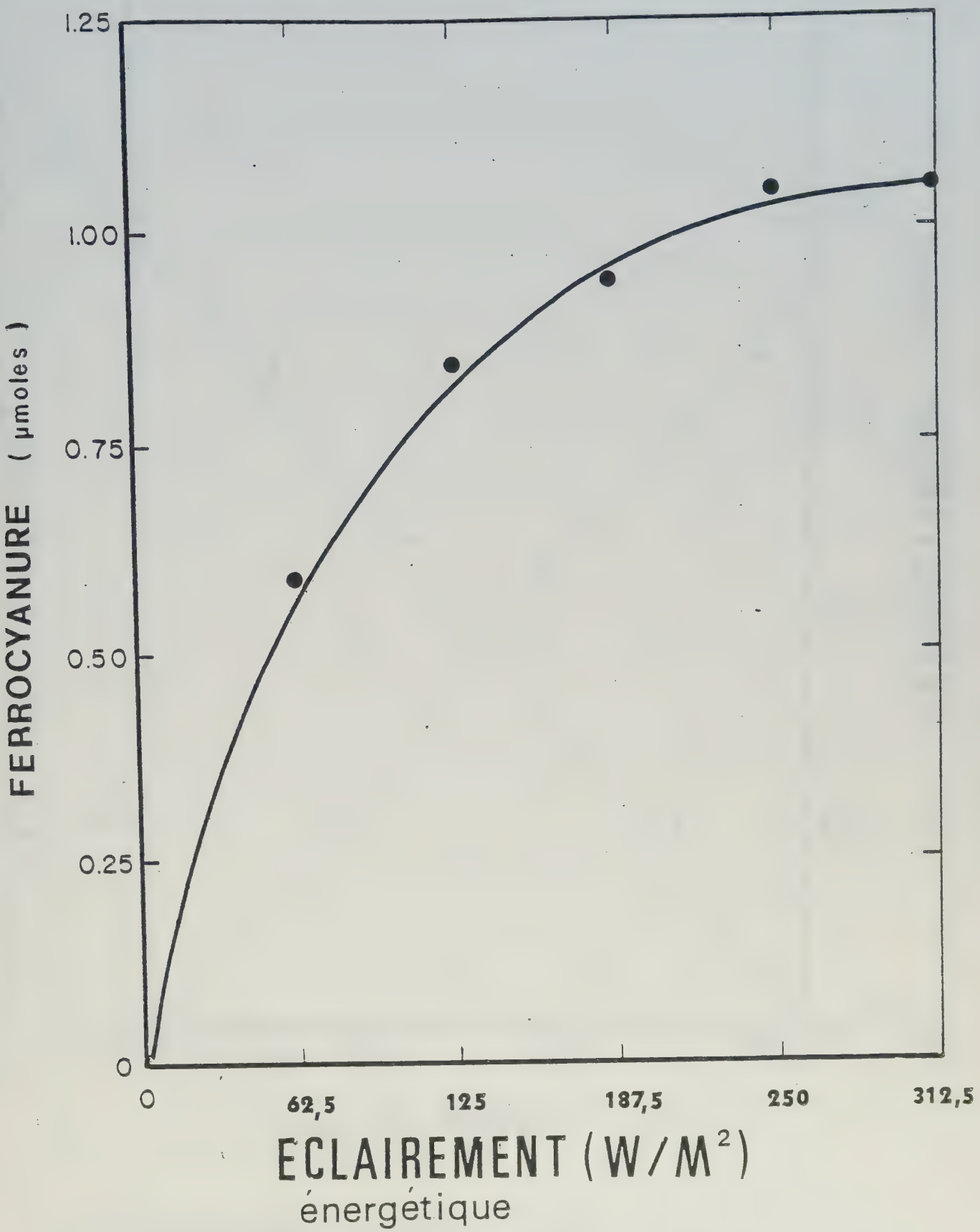


FIGURE 9 : Activité photoréductrice de chloroplastes isolés en fonction de l'intensité lumineuse (*activité spécifique : 250 umoles ferricyanure réduit/mg chlorophylle/heure*)

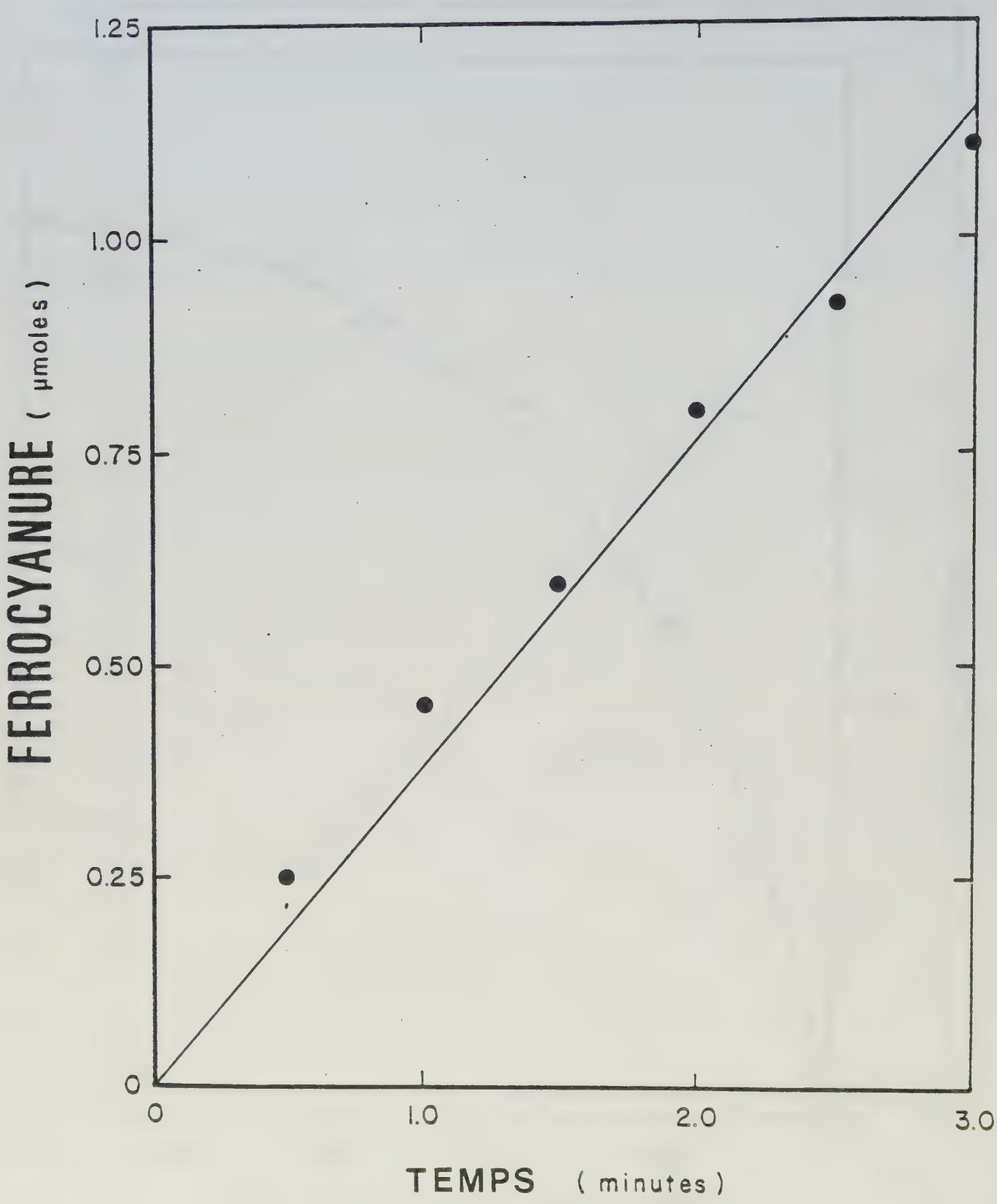


FIGURE 10 : Activité photoréductrice des chloroplastes isolés, en fonction du temps d'éclairement (*activité spécifique 270 µmole ferricyanure réduit/mg chlorophylle/heure*)

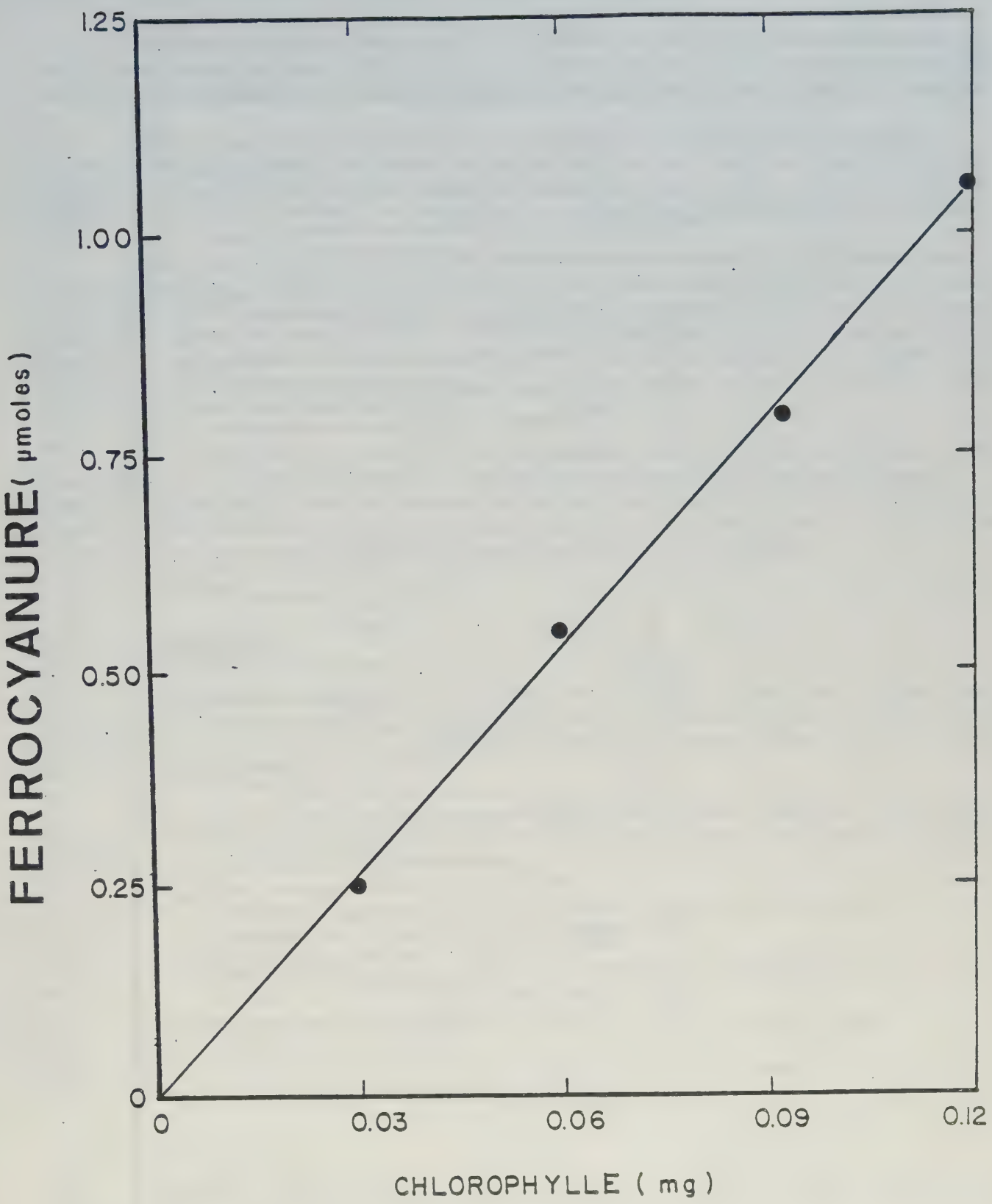


FIGURE 11 : Activité photoréductrice des chloroplastes isolés en fonction de la concentration en chlorophylle *(activité spécifique : 280 µmoles ferricyanure réduit /mg chlorophylle/heure)*

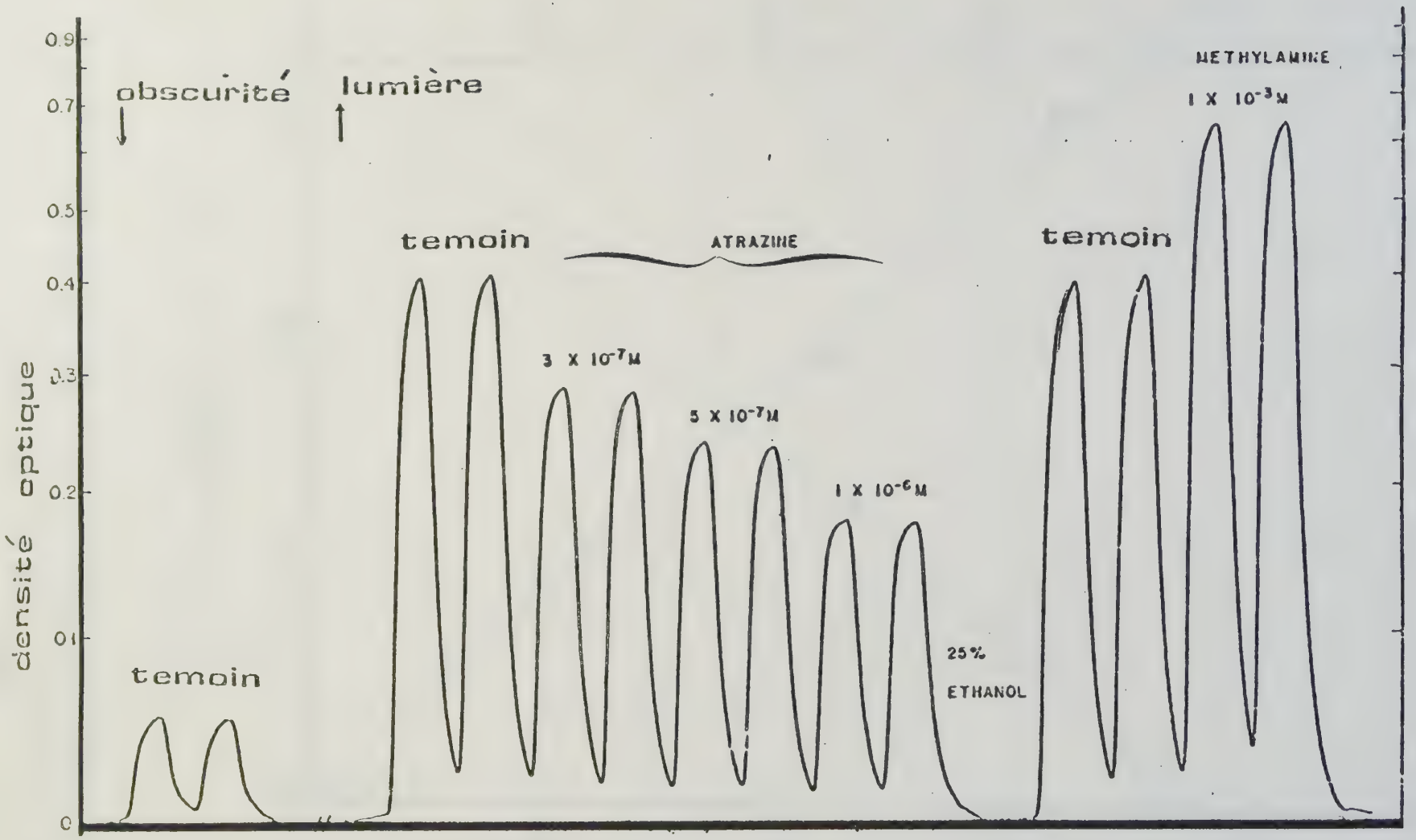


FIGURE 12 ; Enregistrement-type montrant l'activité réductrice à l'obscurité et à la lumière en présence d'un inhibiteur de photosynthèse (atrazine) et d'un découplant (méthylamine) mesurée sur des chloroplastes de pois *(activité spécifique 275 µmoles ferricyanure/mg chlorophylle/heure)*.

1.3.5 Détermination des conditions optimales d'essai

- La réaction colorimétrique doit suivre la loi de BEER-LAMBERT dans la limite des concentrations utilisées. La figure 8 montre la linéarité de densités optiques en fonction de concentrations de ferrocyanure allant jusqu'à 2 µmoles.

- Ni la quantité d'accepteur d'électrons, ni l'intensité lumineuse ne devant devenir facteurs limitants de la photoréduction, une certaine intensité lumineuse est sélectionnée qui sature la réaction ; la figure 9 montre qu'au-dessus de 250 W/m^2, le taux de réduction ne change pas de façon substantielle.

- Pour une intensité lumineuse déterminée, l'activité photoréductrice doit demeurer fonction linéaire de la durée d'éclairement ; le respect de cette condition évite que l'accepteur d'électrons devienne un facteur limitant. La figure 10 montre la linéarité obtenue entre l'activité photoréductrice et la durée d'illumination : ce dernier est sélectionné dans la partie linéaire de la courbe. Si ce point n'est pas respecté, la sensibilité des chloroplastes aux inhibiteurs varie, conduisant à des résultats erronés.

- L'intensité de la réaction de photoréduction doit être directement proportionnelle à la concentration en chloroplastes dans le milieu réactionnel : la figure 11 présente la droite obtenue en portant la concentration en ferrocyanure formé en fonction de la quantité de chlorophylle : au-dessous de 120 γ / ml (non présentés ici) les conditions expérimentales devront être revues.

1.3.6 Déterminations

Que ce soit en utilisant la méthode manuelle ou automatique, chaque essai est répété au moins trois fois. Dans tous les cas, l'activité photoréductrice des chloroplastes varie entre 250 et 350 µmoles de ferricyanure réduit par mg de chlorophylle et par heure.

Un enregistrement typique obtenu à l'auto-analyseur, dans les conditions décrites ci-dessus, à l'exception du nombre de répétitions, est présenté sur la figure 12. Il représente successivement :

- l'activité photoréductrice obtenue à l'obscurité, sur une préparation "témoin", et à la lumière.
- l'inhibition obtenue par 3 concentrations croissantes d'un inhibiteur de photosynthèse.
- l'activité photoréductrice d'un échantillon témoin après "rinçage" à l'éthanol.
- l'action d'un découplant (méthylamine)

Les taux d'inhibition sont calculés en pourcentage du témoin non traité, déduction faite du témoin "obscurité", à partir des hauteurs de pics enregistrées. Les valeurs permettent :

.. / ..

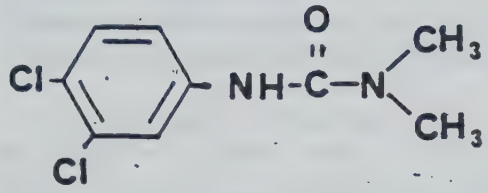
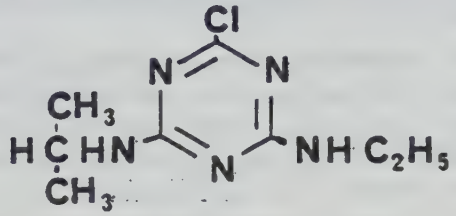
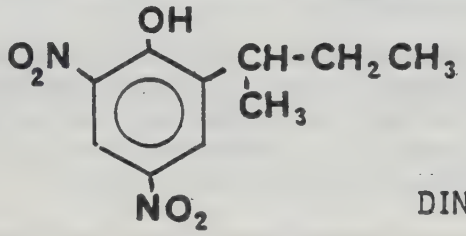
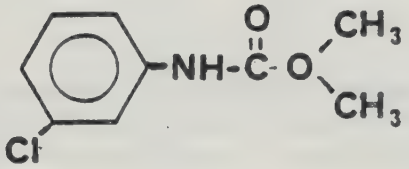
	Manuelle	Automatique
 DCMU	$1.4 \cdot 10^{-7}$ M	$1.9 \cdot 10^{-7}$ M
 ATRAZINE	$5.4 \cdot 10^{-7}$ M	$5.7 \cdot 10^{-7}$ M
 DINOSEBE	$1.5 \cdot 10^{-5}$ M	$1.4 \cdot 10^{-5}$ M
 CHLORPROPHANE	$9.4 \cdot 10^{-5}$ M	$1.2 \cdot 10^{-4}$ M

TABLEAU 2 - Comparaison entre les I_{50} obtenues par les méthodes manuelle et automatique de mesure de la photoréduction du ferricyanure de K par des chloroplastes isolés de pois.

Activité spécifique 275 µmoles Ferricyanure réduit/mg chlorophylle/heure ; durée d'éclairement 3 minutes ; concentration en chlorophylle 120 γ / ml de milieu réactionnel.

```
*** L I N R E G ***

LINEAR REGRESSION ANALYSIS (.195)

VAR          X          Y
OBS
  1        6.528      5.915
  2        6.574      5.426
  3        6.396      5.385
  4        6.619      4.899
  5        6.631      4.560
  6        6.698      4.193

VAR          MEAN              STD DEV
X       6.608223333          .057643589
Y       5.063350000          .632102563

PAR    REGRESSION      STD ERROR      COMPUTED      CONFIDENCE
       COEFFICIENT     REG COEFF      T VALUE     LOWER    LIMITS    UPPER
B0    75.471603948    8.568837439    8.807683245  58.676684566   92.266527330
B1   -10.654642314    1.296651966   -8.217040954 -13.196080168   -8.113204459

CORRELATION .......    -.971633573
F VALUE ...........   67.319789095
STD ERROR .........     .167131935

ANOVAR       DF      SUM OF SQUARES     MEAN SQUARE
REGRESSION    1        1.886035920
RESIDUALS     4         .111732334        .027933083
TOTAL         5        1.9977682
```

FIGURE 13 - Analyse de régression linéaire

- soit de tracer un graphique sur lequel les pourcentages d'inhibition sont portés en abscisse, tandis que les concentrations en inhibiteurs figurent en ordonnée. On obtient ainsi une courbe typique, sigmoïdale, à partir de laquelle il est possible d'obtenir la molarité correspondante à 50 % d'inhibition : cette valeur est appelée I_{50}

- soit de transformer les concentrations en leur co-logarithme et les pourcentages d'inhibition en probits, puis en tirer la valeur correspondant à 50 % d'inhibition : on parle dans ce cas de pI_{50}

En pratique, les pI_{50} sont calculées directement à l'ordinateur IBM-360 en utilisant une analyse de régression, un exemple de laquelle est représenté sur la figure 13.

1.4 Résultats

1.4.1. Comparaison entre les méthodes manuelle et automatisée

Il est impératif que les résultats obtenus avec les deux méthodes soient aussi peu différents que possible les uns des autres. A titre d'exemple, 4 types d'inhibiteurs ont été testés par les deux techniques et les résultats sont rassemblés dans le tableau 2 .

Il en ressort que les différences observées sont faibles et que l'automatisation de la mesure de la photoréduction du ferricyanure ne conduit pas à des résultats erronés.

1.4.2. Résultats obtenus avec les inhibiteurs choisis

Les valeurs de pI_{50} déterminées par la méthode de la mesure automatisée de la réaction de HILL basale, en présence de ferricyanure, sont rassemblées dans le tableau 3 . Les activités spécifiques varient de 275 à 305 µmoles de ferricyanure réduit / mg de chlorophylle / heure et sont indiquées dans le tableau 3

Tous les produits testés sont inhibiteurs de la photoréduction du ferricyanure, sauf la crédazine et les deux diphénylamines, à des degrés variables selon leur structure.

L'objectif de ce travail n'étant pas d'étudier les relations structure - activité existant dans chaque famille, ce point ne sera pas discuté ici ; le nombre limité de représentants de chaque famille chimique interdirait, en tout état de cause, une analyse correcte. Notre but est de mettre en évidence un site et un mode d'action communs à tous les inhibiteurs, ce qui requiert une meilleure connaissance des intéractions possibles molécule-cible.

TABLEAU 3

pI_{50} obtenues sur la photoréduction du Ferricyanure (réaction de HILL basale)

Activités spécifiques exprimées en µmoles de Ferricyanure réduites/mg chlorophylle/heure

(1) : 276 , (2) : 285 , (3) : 304 , (4) : 290

Famille Chimique	Produit	pI_{50}
N - Phénylurées (1)	D C M U	6.82
	Linuron	5.95
	RU 12.069	4.7
	Metobromuron	5.49
	Chlortoluron	6.02
	RU 12.800	5.25
	Ipuron	5.98
	Fluometuron	5.12
N - Phényle-carbamates (1)	RU 22.587	4.90
	Barbane	4.0
N - Acylanilides (2)	Propanil	5.29
	Monalide	4.86
	Dicryl	5.61
	RU 21.270	4.58
Diphénylalanines (2)	Amine 1	0
	Amine 2	0
s - triazines (2)	Atrazine	5.76
	Propazine	5.62
	Simazine	5.44
	Norazine	5.25
	RU 12.259	6.27
Hydroxybenzonitrile halogéné (3)	Ioxynil	6.57
Uraciles (3)	Lénacile	6.67
	RU 12.068	6.62
	RU 12.709	6.18
Urée cyclisée (3)	RU 15.086	4
Pyridazinones (3)	Pyramine	5.85
	RU 2594	3.65
Triazinone (4)	Métribuzin	6.57
Ethers (4)	Nitrofène	4.25
	Crédazine	0
Thiadiazoles (4)	RU 21.731	5.55
	RU 21.827	4.98
Dinitroaniline (4)	Trifluraline	4.85

2 - MESURE DU TRANSPORT D'ELECTRONS COUPLE A LA PHOTOPHOSPHORYLATION NON CYCLIQUE

2.1. H_2O ⟶ Ferricyanure

2.1.1. Introduction

Nous avons vu que les inhibiteurs étudiés interfèrent avec le transport d'électrons lorsque l'eau est donneuse et le ferricyanure accepteur. Toutefois, le terme d'inhibiteurs découplants ayant été employé dans la littérature, il peut être important de vérifier si ces inhibiteurs agissent sur le transport d'électrons seul ou (et) sur la photophosphorylation qui lui est couplée.

Dans le cas de chloroplastes pelés, isolés selon la technique décrite précédemment, le degré de couplage entre le transport d'électrons et la phosphorylation est variable ; on observe en effet un transport d'électrons appréciable en l'absence d'ADP ou de phosphate ; l'addition d'un découplant stimule à des degrés divers le transport d'électrons. Par suite, il est intéressant de mesurer l'action des inhibiteurs dans les conditions suivantes :

. chloroplastes complétement découplés
. chloroplastes capables d'activités phosphorylantes

2.1.2. Techniques

2.1.2.1. Extraction et pré-traitement des chloroplastes

Lorsqu'une préparation de chloroplastes doués d'activité phosphorylatrice est requise, ceux-ci sont extraits tel que cela est décrit dans le § 1.2.1.

Pour obtenir des chloroplastes "découplés", on peut avoir recours soit à des techniques perturbant les propriétés de la membrane lamellaire, soit en éliminant le facteur de couplage. Dans le premier cas, il faut faire appel à l'utilisation d'amines aliphatiques qui permettent la neutralisation des protons internes (Mc CARTY et A. COLEMAN, 1979)soit des dérivés phénylhydrazoniques qui rendent la membrane perméable aux protons (HOPFER et al, 1968). La réactivité chimique de ces derniers en interdit toutefois l'emploi en tant que molécules purement découplantes.L'élimination du facteur de couplage (CF_1) par un traitement modéré à l'EDTA nous semble préférable.

En pratique, lors du broyage 0,75 mmoles d'EDTA, pH 8,0, sont ajoutés, ce qui a pour conséquence la perte de CF_1 (AVRON, 1963) et l'obtention de chloroplastes découplés. Les lavages ultérieurs éliminent l'EDTA présent dans le milieu de broyage.

2.1.2.2. Mesures

2.1.2.2.1 Milieu réactionnel

Celui-ci est constitué des éléments nécessaires à la photoréduction et à la photophosphorylation. Il comprend en micromoles pour 5 ml :

- Tampon Tris HCl (pH 8.0) 80
- Na Cl 50
- $Mg\ Cl_2$ 10
- $Na_2\ H\ PO_4$ (pH 8.0) 2
- A D P 5
- Ferricyanure de potassium 2
- Chloroplastes équivalents à .... 75 γ chlorophylle / ml

TABLEAU 4

pI_{50} obtenues sur des préparations chloroplastiques couplées ou découplées (H_2O → Ferricyanure)

Famille chimique	Produits	Transport d'électrons basal	Transport d'électrons chloroplastes "découplés"	Transport d'électrons "couplé"	Phosphorylation non-cyclique
A	D C M U	(1) 6,82	(5) 6,75	(8) 6,89	(11) 6,78
	Linuron	5,95	5,78	5,80	5,68
	RU 12.069	4,70	4,65	4,69	4,81
	Metobromuron	5,49	5,62	5,55	5,50
	Chlortoluron	6,02	5,97	6,18	6,20
	RU 12.800	5,25	5,30	5,41	5,45
	Fluometuron	5,12	5,05	5,22	5,34
B	RU 22.587	(1) 4,90	(5) 4,95	(8) 5,62	(11) 5,75
	Barbane	4,0	4,10	5,44	5,53
C	Propanil	(2) 5,29	(5) 5,20	(8) 6,15	(11) 6,32
	Monalide	4,86	4,95	5,62	5,73
	Dicryl	5,61	5,69	6,54	6,48
	RU 21.270	4,58	4,62	5,48	5,61
D	Atrazine	(3) 5,76	(5) 5,82	(8) 5,60	(11) 5,78
	Propazine	5,62	5,78	5,84	5,68
	Simazine	5,44	5,49	5,51	5,60
	Norazine	5,25	5,20	5,18	5,33
	RU 12.259	6,27	6,32	6,43	6,18
E	Ioxynil	(3) 6,57	(6) 6,52	(9) 7,02	(12) 7,15
F	Lénacile	(3) 6,67	(6) 6,51	(9) 6,72	(12) 6,60
	RU 12.068	6,62	6,71	6,53	6,56
	RU 12.709	6,18	6,30	6,42	6,45
G	RU 15.086	(3) 4,0	(6) 4,17	(9) 4,04	(12) 4,25
H	Pyramine	(3) 5,85	(7) 5,78	(10) 5,63	(13) 5,75
	RU 2594	3,65	3,78	3,82	3,80
I	Metribuzin	(4) 6,57	(7) 6,63	(10) 6,54	(13) 6,70
J	Nitrofène	(4) 4,25	(7) 4,31	(10) 4,38	(13) 4,34
K	RU 21731	(4) 5,55	(7) 5,63	(10) 6,39	(13) 6,45
	RU 21827	4,96	4,83	5,63	5,71
L	Trifluraline	(4) 4,85	(7) 4,75	(10) 5,49	(13) 5,60

- Activités spécifiques : µmoles Ferricyanure/mg chorophylle/heure =

(1) : 276 (2) : 285 (3) : 304 (4) : 290 (5) : 283
(6) : 310 (7) : 315 (8) : 462 (9) : 450 (10) : 438

: µmoles ATP formés/mg chlorophylle/heure = (11) : 185 (12) : 175 (13) : 140

A : N-phénylurée B : N-phénylcarbamate C : N-acylanilide D : s-triazine
E : hydroxybenzonitrile halogéné F : Uracile G : urée cyclisée H : pyridazinone
I : triazinone J : diphényléther K : thiadiazole L : dinitroaniline

2.1.2.2.2 Essais

Dans le cas de la mesure de la photoréduction du ferricyanure par des chloroplastes "découplés", le protocle expérimental est identique à celui décrit dans le § 1.3.1. de ce chapitre.

La mesure de l'activité phosphorylante est effectuée sur le même milieu réactionnel dans lequel la photoréduction du ferricyanure a été réalisée (WHATLEY et ARNON, 1962) : après illumination de la suspension de chloroplastes, et en prenant les précautions décrites dans le § 1.3.3. de ce chapitre, 1 ml d'acide trichloroacétique à 10 % est ajouté. Le milieu réactionnel est centrifugé pendant 5 minutes à 1000 g et la teneur en ferricyanure mesurée spectrophotométriquement à 420 nm.

La concentration en phosphate est mesurée dans le même milieu réactionnel acidifié en prélevant une partie aliquote de 0.5 ml à laquelle sont ajoutés 5 ml du réactif de TAUSSKY et SHORR (1958).

La densité optique du complexe est lue à 740 nm.

La teneur en ATP formée est calculée à partir de la quantité de phosphate disparue dans la suspension de chloroplastes, par rapport à un "témoin" maintenu à l'obseurité.

2.1.2.2.3 Résultats et Discussion

Les valeurs de pI_{50} obtenues avec les différents inhibiteurs pour la photoréduction du ferricyanure par des préparations de chloroplastes découplés, et couplés, ainsi que la photophosphorylation sont rassemblés dans le tableau 4 auxquelles ont été ajoutées pour comparaison les pI_{50} obtenues sur le transport d'électrons basal.

L'examen des résultats d'inhibition permet de dégager un certain nombre de points :

- les chloroplastes congelés sont pratiquement totalement découplés puisque leurs activités spécifiques sont peu différentes de celles mesurées sur les chloroplastes découplés par pré-traitement à l'EDTA
- la sensibilité aux inhibiteurs du transport d'électrons basal ne diffère pas notablement de celle observée sur le transport d'électrons de chloroplastes découplés
- lorsque les chloroplastes sont placés en conditions telles que la photophosphorylation puisse être mesurée, on distingue 2 classes de produits : ceux dont les pI_{50} ne diffèrent pas quelles que soient les conditions expérimentales (transport d'électrons basal découplé ou couplé), que ce soit au niveau de l'activité photoréductrice que phosphorylation. Par contre, une 2ème catégorie se distingue par le fait que le transport d'électrons et la phosphorylation qui lui est couplée sont substantiellement plus sensibles aux inhibiteurs, regroupant les familles suivantes : *N-phényle-carbamates, N-acylanilides, hydroxybenzonitriles halogénés, thiadiazoles et dinitroaniline.*

Une première conclusion peut être tirée des résultats présentés ici : certaines molécules n'interfèrent pas avec les photophosphorylations (phényl-urées, s-triazines, uraciles, urées cyclisées, pyridazinones, triazinones, diphényléthers, tandis que d'autres semblent avoir une certaine action sur ce processus (N-phényl-carbamates, hydroxybenzonitriles, thiadiazoles et dinitro-anilines).

Dans le premier cas, l'inhibition de la photophosphorylation non cyclique n'est vraisemblablement qu'une conséquence du blocage du transport d'électrons, tandis que dans le deuxième cas, une certaine additivité entre inhibition du transport d'électrons et de la phosphorylation peut exister .

2.2. $H_2O \longrightarrow NADP^+$

Dans ce cas, l'accepteur d'électrons artificiel est remplacé par $NADP^+$, sa réduction par les chloroplastes est mesurée spectrophotométriquement tandis que la phosphorylation qui lui est couplée est évaluée d'une manière identique à celle décrite dans le paragraphe 2.1.2.2.2.

2.2.1. Méthodes

2.2.1.1. Extraction des chloroplastes :

ils sont extraits selon le protocole décrit dans le paragraphe 1.2.1., seul le tampon d'extraction est légèrement modifié et est constitué de :

- saccharose 0.4 M
- tampon tricine 0.05 M - pH 7,8
- Na Cl 0.1 M

Lors de l'extraction des chloroplastes pelés, la ferredoxine est en grande partie solubilisé dans le tampon, par suite, il est nécessaire d'en ajouter dans le milieu réactionnel, faute de quoi les activités spécifiques exprimées en µmoles de $NADP^+$ réduit, sont très faibles. La ferredoxine est extraite et purifiée à partir de feuilles d'épinards selon la méthode décrite par RAO *et al (1971)*.

2.2.1.2. Mesures

Le milieu réactionnel (5ml) est constitué de :

- tampon Tris HCl - pH 8 80 µmoles
- Na Cl 50 "
- $Mg\ Cl_2$ 10 "
- $Na_2\ H\ PO_4$ (pH 8.0) 2 "
- A D P 5 "
- $N\ A\ D\ P^+$ 2 "
- Ferredoxine : concentration saturante
- Chloroplastes correspondants à 75 γ de chlorophylle

Après éclairement, la suspension chloroplastique est centrifugée pendant 5 minutes à 10000 g et la densité optique mesurée sur le surnageant à 340 nm.

La teneur en phosphate utilisé par phosphorylation est mesurée sur le surnageant par la méthode de TAUSSKY et SHORR (1953).

TABLEAU 5

pI_{50} obtenues sur photoréduction et photophosphorylation ($H_2O \rightarrow NADP^+$)

Famille chimique	Produits	Réduction du $NADP^+$	Phosphorylation non cyclique
N-phénylurées	DCMU	6,85 (1)	6,53 (3)
	Linuron	5,60	5,23
	RU 12069	4,20	4,82
	Metobromuron	5,62	4,14
	Chlortoluron	5,92	3,86
	RU 12800	5,3	4,70
	Ipuron	5,40	5,03
	Fluometuron	4,8	5,03
N-phénylcarbamates	RU 22587	4,90 (1)	5,20 (3)
	Barbane	absorbée à 340 nm	4,38
N-acylanilides	Propanil	5,6 (1)	4,58 (3)
	Monalide	4,7	4,38
	Dicryl	5,25	5,05
	RU 21270	4,35	4,45
Diphénylamines	Amine - 1	4,21 (1)	4,42 (3)
	Amine - 2	5,20	5,12
s-triazines	Atrazine	5,o3 (1)	4,89 (3)
	Propazine	5,55	4,94
	Simazine	5,33	3,39
	Norazine	5,81	4,76
	RU 12259	6,5	6,09
Benzonitrile	Ioxynil	6,02 (2)	5,95 (4)
Uraciles	Lénacile	6,53 (2)	6,70 (4)
	RU 12068	6,27	6,33
	RU 12709	6,18	6,59
Urée cyclisée	RU 15085	5,45 (2)	6,65 (4)
Pyridazinones	Pyramine	5,55 (2)	5,83 (4)
	RU 2594	3,12	3,65
Triazinone	Metribuzin	6,45 (2)	5,85 (4)
Diphényléther	Nitrofène	4,33 (3)	4,10 (5)
Phénoxypyridazine	Crédazine	3,22 (3)	3,45 (5)
Thiadiazole	RU 21731	5,18 (3)	5,40 (5)
	RU 21827	4,89	3,92
Dinitroaniline	Trifluraline	4,53 (3)	4,85 (5)

- Activités spécifiques :

µmoles de $NADP^+$ réduit/mg chlorophylle/heure =
(1) : 120 (2) : 115 (3) : 107

µmoles d'ATP formé/mg chlorophylle/heure =
(3) : 117 (4) : 112 (5) : 103

2.2.1.3 Résultats et Discussion

Les valeurs de pI_{50} obtenues sur la photoréduction du $NADP^+$ et la phosphorylation non-cyclique couplée sont présentées dans le tableau 5.
L'analyse comparée de ces résultats montre que les sensibilités des activités photoréductrice et phosphorylatrice aux inhibiteurs diffèrent peu. Cette observation peut être interprétée comme étant le reflet d'une inhibition de la photophosphorylation non-cyclique provenant d'un blocage du transport d'électrons entre H_2O et $NADP^+$, sans qu'un effet découplant secondaire . puisse être mis en évidence, ce qui est en contradiction apparente avec ce qui a été proposé dans le paragraphe 2.1.2.2.3 Nous reviendrons sur ce point dans la discussion générale de ce chapitre, après avoir précisé si les inhibiteurs testés possédaient une action sur la photophosphorylation cyclique et sur le PS I.

3 - MESURE DE LA PHOSPHORYLATION CYCLIQUE

Depuis les travaux de JAGENDORF et AVRON (1958), les dérivés de la phénazine (notamment la PMS) ont été largement utilisés comme cofacteurs de la photophosphorylation cyclique *via* le PS I. Il faut remarquer que le flux d'électrons cyclique requiert un équilibre redox précis qui dépend du médiateur d'électrons utilisé (HAUSKA et al, 1970). Ainsi, il a été montré que seuls les médiateurs possédant un potentiel redox négatif peuvent catalyser la réaction, ce qui implique que PQ soit le site d'intéraction (KANDLER, 1960). Cette remarque a son importance comme nous le verrons plus loin.

3.1. Techniques

Les chloroplastes sont extraits tel que cela est décrit dans le paragraphe 1.2.1.

3.1.1 Milieu réactionnel

il est constitué des éléments suivants dans un volume de 5 ml :

- Tampon Tris HCl 0,2 M pH 8 — 80 µmoles
- Na Cl — 50 "
- $Mg\ Cl_2$ — 10 "
- $Na_2\ H\ PO_4$ — 2 "
- A D P — 5 "
- P M S — 0,2
- chloroplastes correspondants à : 75 γ chlorophylles

3.1.2 Essai

La réaction doit être effectuée en anoxie complète, faute de quoi une mesure de la photophosphorylation avec O_2 comme accepteur d'électrons est obtenue. Par suite, le milieu réactionnel est balayé avant et pendant l'essai par un courant d'azote. Après éclairement de la préparation chloroplastique, 1 ml de TCA à 10 % est ajouté, et la teneur en phosphate déterminée selon la méthode de TAUSSKY et SHORR (1953).

TABLEAU 6

pI_{50} *ou pourcentages d'inhibition à* 10^{-4} *M*
de la photophosphorylation cyclique catalysée par la PMS

Activité spécifique : 220 µmoles d'ATP formé/mg chlorophylle/heure

Famille chimique	Produits	Photophosphorylation cyclique
N-phénylurées	D C M U	*15 %*
	Linuron	*10 %*
	RU 12069	*0*
	Métobromuron	*32 %*
	Chlortoluron	*37 %*
	RU 12800	*22 %*
	Ipuron	*21 %*
	Fluometuron	*35 %*
N-phénylcarbamates	RU 22587	4,62
	Barbane	3,81
N-acylanilides	Propanil	5,11
	Monalide	4,57
	Dicryl	5,24
	RU 21270	4,13
Diphénylamines	Amine - 1	0
	Amine - 2	0
s-triazines	Atrazine	*5 %*
	Propazine	*2 %*
	Simazine	*0*
	Norazine	*7 %*
	RU 12259	*15 %*
Benzonitrile	Ioxynil	5,96
Uraciles	Lénacile	*12 %*
	RU 12068	*7 %*
	RU 12709	*15 %*
Urée cyclisée	RU 15086	*3 %*
Pyridazinones	Pyramine	*21 %*
	RU 2594	*17 %*
Triazinone	Metribuzin	*12 %*
Diphényléther	Nitrofène	*23 %*
Phénoxypyridazine	Crédazine	*12 %*
Thiadiazoles	RU 21731	5,33
	RU 21827	4,52
Dinitroaniline	Trifluraline	4,72

3.1.3 Résultats et Discussion

Les valeurs de pI_{50} ou de pourcentage d'inhibition obtenus sur la photophosphorylation cyclique par les divers inhibiteurs testés sont présentées dans le tableau 6. . Les résultats montrent clairement que nous sommes en présence de 2 catégories d'inhibiteurs : ceux qui inhibent la phosphorylation cyclique (N-phényle-carbamates, N-acylanilides, hydrobenzonitrile, thiadiazoles et dinitroanilines) et ceux qui sont pratiquement sans effet sur ce processus (N-phénylurées s-triazines, diphénylamines, uraciles, urées cyclisées, pyridazinones, triazinones et éthers).

Il est important de noter que cette dichotomie correspond aux deux groupes de structures chimiques produisant une inhibition supérieure du transport d'électrons (H_2O → Ferricyanure) et de la photophosphorylation non cyclique lorsque ceux-ci sont couplés, par rapport au transport d'électrons mesuré sur chloroplastes découplés. En d'autres termes, l'idée d'une dualité de sites d'action est à envisager avec les inhibiteurs du premier groupe. Essayer de répondre à cette question revient à démontrer une inhibition éventuelle au niveau de PS II et de PS I, soit sur le transport d'électrons, soit sur un (ou deux) site (s) de conservation d'énergie. La mesure du transport d'électrons et de la photophosphorylation couplée catalysés par PS I doit permettre d'éclaircir en partie ce point.

4 - MESURE DU TRANSPORT D'ELECTRONS ET DE LA PHOSPHORYLATION EN PRÉSENCE D'UN DONNEUR D'ÉLECTRONS AU PS I ($DCPIP_{red}$ → $NADP^+$)

La photoréduction de $NADP^+$ par le DCPIP réduit à la lumière par des chloroplastes a été démontrée en premier lieu par VERNON et ZAUGG (1960) sans qu'une phosphorylation ait pu lui être associée ; simultanément LOSADA, WHATLEY, et ARNON (1961) proposaient un schéma mettant en évidence 2 photoréactions dont l'une comportait la réduction de $NADP^+$ et une phosphorylation associée, en présence de DCPIP réduit, fournissant ainsi un support à l'hypothèse émise par HILL et BENDALL (1960). Depuis, la mesure de la réduction de $NADP^+$ en présence de DCMU et de DCPIP réduit par l'acide ascorbique a été largement utilisée comme indicateur de l'activité PS I.

4.1. Techniques

Les chloroplastes sont extraits tel que cela a été décrit dans le paragraphe 2.2.1.1.

TABLEAU 7

pI_{50} *(ou pourcentages d'inhibition à une concentration finale de* 10^{-4} M) obtenues sur la photoréduction du $NADP^+$ et la photophosphorylation catalysée par le PS I (DCPIP red → $NADP^+$)

Famille chimique	Produits		Transport d'électrons	Photophosphorylation
N-phénylurées	DCMU	(1)	-	-
	Linuron		13 %	*15 %*
	RU 12.069		0	*12 %*
	Métobromuron		40 %	*37 %*
	Chlortoluron		45 %	*39 %*
	RU 12.800		33 %	*27 %*
	Ipuron		25 %	*25 %*
	Fluométuron		41 %	*43 %*
N-phénylcarbamates	RU 22.587	(1)	34 %	4,21
	Barbane		Absorbe à 340 nm	3,83
N-acylanilides	Propanil	(1)	26 %	5,23
	Monalide		31 %	4,49
	Dicryl		36 %	4,77
	RU 21.270		11 %	4,33
Diphénylamines	Amine 1	(1)	3 %	0
	Amine 2		0	*3 %*
s-triazines	Atrazine	(2)	0	0
	Propazine		0	*10 %*
	Simazine		20 %	*18 %*
	Norazine		3 %	*7 %*
	RU 12.259		18 %	*15 %*
Benzonitrile	Ioxynil	(2)	15 %	5,80
Uraciles	Lénacile	(2)	7 %	*9 %*
	RU 12.068		24 %	*18 %*
	RU 12.709		20 %	*15 %*
Pyridazinones	Pyramine	(2)	22 %	*19 %*
	RU 2594		17 %	*21 %*
Triazinone	Metribuzin	(2)	13 %	*10 %*
Diphényléther	Nitrofène	(2)	22 %	4,25
Phénoxypyridazine	Crédazine		11 %	3,72
Thiadiazoles	RU 21.731	(2)	17 %	5,12
	RU 21.827		13 %	4,37
Dinitroanilines	Trifluraline	(2)	27 %	4,68

Activité spécifique :

. Réduction du $NADP^+$ (µmoles/mg chlorophylle/heure) :
(1) 41
(2) 47

. Phosphorylation (µmoles ATP formés/mg chlorophylle/heure) :
(1) 35
(2) 38

4.1.1. Milieu réactionnel

Il est constitué des éléments suivants, exprimés en µmoles (volume total 5 ml) :

- Tampon Tris HCl - pH 8 - 0.2 M	80
- Na Cl	50
- N A D P	2
- Ascorbate de sodium	20
- D C P I P	0,3
- D C M U	1
- $Mg\ Cl_2$	10
- $Na_2\ H\ PO_4$ - pH 8 -	2
- A D P	5
- Ferredoxine	concentration saturante
- Chloroplastes	équivalents à 75 γchlorophylle

4.1.2. Essais

Le milieu réactionnel, après éclairement, est centrifugé et la D.O. lue à 340 nm, (3 à 5 minutes), avant l'addition de TCA à 10 %. Celui-ci est ensuite ajouté (1 ml) et la teneur phosphate minéral non utilisé est mesurée selon la méthode de TAUSSKY et SHORR (1953).

4.2 - Résultats et Discussion

Les valeurs de pI_{50} (ou le % d'inhibition à une concentration finale en inhibiteur de 10^{-4} M) obtenues sur la réduction du $NADP^+$ en présence de DCPIP réduit par l'acide ascorbique, ainsi que sur la phosphorylation couplée à ce transport d'électrons, sont présentées dans le tableau 7 . L'examen de ces résultats permet de dégager deux observations importantes :

- aucun des inhibiteurs testés ne bloque de façon substantielle le transport d'électrons entre DCPIP réduit et $NADP^+$.
  En d'autres termes, ces molécules ont une influence négligeable sur l'activité photoréductrice catalysée par le PS I.
- En ce qui concerne la photophosphorylation couplée au transport d'électrons entre DCPIP et $NADP^+$, on observe deux groupes de familles chimiques :
  - . celles ne présentant pas d'effet notable sur ce processus : *N-phénylurées, diphénylamines, s-triazines, uraciles, pyridazinones et triazinones*

  et
  - . celles qui inhibent fortement la phosphorylation : *N-phénylcarbamates, N-acylanilides, hydroxybenzonitrile halogéné, éthers, thiadiazoles et dinitroanilines.*
    Il est intéressant de noter que ce sont précisément les familles chimiques inhibant la phosphorylation cyclique catalysée par PMS (voir § 3.) qui interfèrent avec la photophosphorylation couplée au transport d'électrons entre DCPIP et $NADP^+$, sauf les éthers qui ne bloquent pas la phosphorylation cyclique

Ces observations seront discutées en comparaison avec les résultats obtenus sur les autres réactions photochimiques, dans le § 5.

5 - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'examen comparatif des résultats présentés dans ce chapitre suggère un certain nombre de remarques et de premières conclusions :

- Tous les inhibiteurs testés sont de bons inhibiteurs du transport d'électrons non cyclique lorsque l'eau est donneur et le $NADP^+$ ou le ferricyanure accepteurs d'électrons. Les photophosphorylations qui sont couplées sont également inhibées, généralement dans un même ordre de grandeur, exprimé en pI_{50}, de celui obtenu sur l'activité photoréductrice.

- Aucun des produits testés ne bloque de façon substantielle le transport d'électrons lorsque le DCPIP réduit par l'acide ascorbique est donneur d'électrons et le $NADP^+$ accepteur, réaction qui est catalysée par le PS I. En d'autres termes, il est possible de placer les molécules étudiées dans la catégorie des inhibiteurs du PS II, en raisonnant par élimination, sans que l'on puisse préciser à quel niveau exact de la chaîne de transporteur d'électrons se trouve le site d'action.

- Les phosphorylations cyclique (catalysée par PMS) et non cyclique (catalysée par le PS I) sont inhibées par les représentants de certaines familles chimiques (*N-phényle-carbamates, N-acylanilides, hydroxybenzonitrile halogéné, thiadiazoles et dinitroanilines*).

Lorsque l'eau est le donneur d'électrons, et le $NADP^+$ ou le ferricyanure accepteurs, les inhibitions observées sur la photophosphorylation peuvent être une conséquence du blocage du transport d'électrons ; toutefois, les familles chimiques mentionnées ci-dessus présentent, d'une manière générale, des taux d'inhibition supérieurs lorsque les chloroplastes sont "couplés" par rapport à des préparations dans lesquelles les chloroplastes sont faiblement couplés ou totalement découplés. Le cas des éthers présente une ambiguïté puisque ces produits bloquent la phosphorylation cyclique catalysée par le PS I et non par la PMS.

La première conclusion importante de ces résultats est que l'on peut subdiviser les inhibiteurs en 2 classes, selon la nomenclature proposée par MORELAND et HILTON (1976) et évoquée en § 2.1.4. du Chapitre I :

Inhibiteurs du transport d'électrons	Inhibiteurs découplants
N-phénylurées	*N-phénylcarbamates*
Diphénylamines	*N-acylanilides*
s-triazines	*hydroxybenzonitrile halogéné*
Uraciles	*Thiadiazoles*
Urées cyclisées	*Dinitroanilines*
Thiazinone	*Ethers ?*
Ethers	
Pyridazinones	

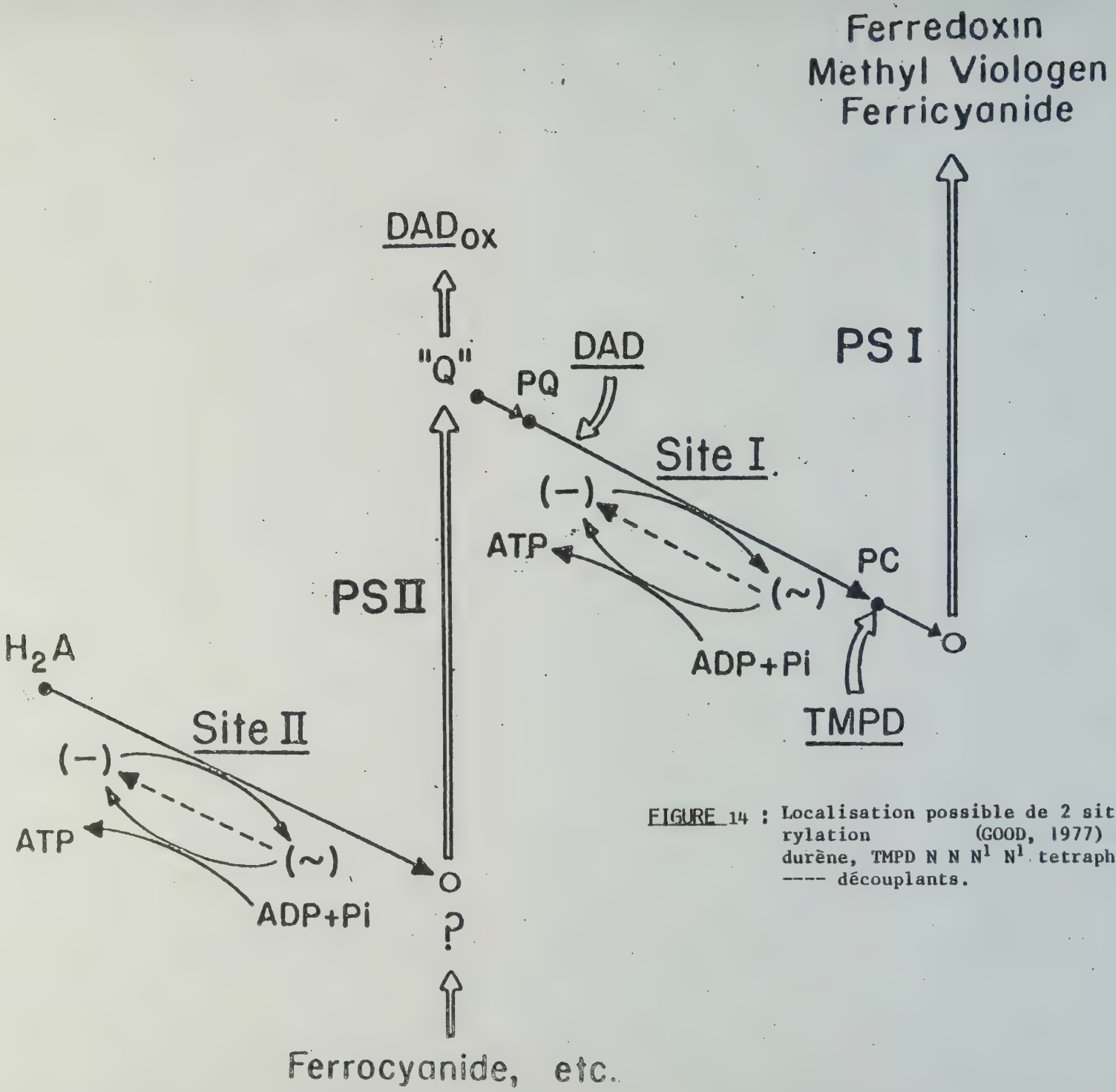
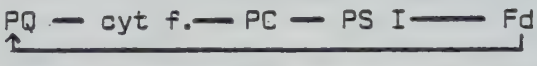


FIGURE 14 : Localisation possible de 2 sites de phosphorylation (GOOD, 1977) DAD : diaminodurène, TMPD N N N^1 N^1 tetraphenylenediamine ---- découplants.

Par ailleurs, les résultats présentés ici pourraient être considérés comme apportant un certain support expérimental à l'hypothèse de l'existence de deux sites (Figure 14) de conservation d'énergie (TREBST et REIMER, 1973, REEVES et HALL, 1973) dans la mesure où l'on peut s'assurer que les inhibiteurs étudiés sont sans action sur le côté donneur du PS II. En effet, un site de conservation d'énergie est lié à la photooxydation de l'eau (site II) (TREBST et REIMER, 1973 a- JUNGE et AUSLANDER, 1973), tandis qu'un second est associé à la plastoquinone (site I) TREBST et REIMER (1973), IZAWA et al (1973). Par suite, l'observation d'un blocage de phosphorylation par les "inhibiteurs découplants" uniquement, lorsque le transport d'électrons (cyclique et non cyclique) est catalysé par le PS I, indique bien l'existence d'un site de conservation d'énergie couplé à une séquence :



Dans le cas de la photophosphorylation couplée au transport d'électrons catalysée par PS I (DCPIP réduit → $NADP^+$), seule la photophosphorylation est inhibée par les "inhibiteurs découplants", indiquant que les substances du type "inhibiteur de transport d'électrons" sont sans effet sur le site II. Toutefois, le caractère artificiel du (ou) des site(s) de conservation d'énergie a été évoqué et étudié d'une façon intensive par l'équipe de TREBST (HAUSKA et al, 1974 - TREBST, 1974). En effet, le couplage entre phosphorylation et oxydation d'un donneur artificiel d'électrons n'est possible que dans la mesure où des protons sont libérés vers l'intérieur de la membrane du thylacoïde, tout au moins en ce qui concerne le site I (TREBST, 1974). La PMS réduite peut donner ses électrons directement à la P-700 (RUMBERG et WITT, 1964), tandis que les protons peuvent être transportés via la PMS réduite, remplissant ainsi les conditions requises par la théorie chimiosmotique de MITCHELL (1961), mais suggérant la possibilité d'un site artificiel de conservation d'énergie (HAUSKA, 1972, 1977).

Il semble difficile de développer des expérimentations permettant de préciser la nature de l'effet découplant pour les inhibiteurs doués de cette propriété apparente, ne serait-ce que par l'ambigüité de ce terme. De plus, l'objectif de ce travail est de rechercher un site d'action commun, et non unique, des substances étudiées, sur les photoréactions. Des études récentes entreprises sur des biotypes d'adventices résistants à l'atrazine permet, par ailleurs, de conclure que l'effet herbicide est une conséquence de l'inhibition du transport d'électrons dans les chloroplastes des plantes traitées, et non nécessairement une perturbation directe des phosphorylations. En effet, la résistance à l'atrazine observée chez *Chenopodium album* provient d'une insensibilité des chloroplastes à cet herbicide, tandis que le biotype sensible au même produit est détruit (SOUZA-MACHADO et al, 1978). Nous avons montré que l'atrazine était un inhibiteur du transport d'électrons, sans action sur les phosphorylations ; ces observations suggèrent de s'attacher à rechercher avec le plus de précision possible le site d'action principal des divers inhibiteurs étudiés, en comparaison avec la DCMU.

DEUXIEME PARTIE

MISE EN EVIDENCE D'UN SITE D'ACTION COMMUN A CERTAINS INHIBITEURS DE REACTIONS PHOTOCHIMIQUES

CHAPITRE I

MESURES D'INDUCTION DE FLUORESCENCE DE LA CHLOROPHYLLE ^{a} EN PRESENCE D'INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHESE

1 - INTRODUCTION

Du chapitre précédent, il est possible de déduire que les inhibiteurs étudiés doivent agir dans une région proche du centre réactionnel du PS II, en gardant en mémoire que cette observation a été largement démontrée dans le cas de DCMU. Les expérimentations présentées précédemment ne permettent toutefois pas d'identifier le site d'action de la DCMU à celui des autres substances. Dans cette optique, une étude comparative approfondie de l'action des divers produits vis-à-vis du PS II doit être entreprise, mais en se limitant à des expériences soigneusement choisies devant donner le maximum de renseignements tout en maintenant un minimum de sophistication dans l'approche méthodologique ; à cet égard, l'étude de la fluorescence de la Chl_a paraît être une technique particulièrement appropriée.

On peut définir le complexe réactionnel du PS II comme utilisant un singulet de l'excitation électronique de la Chl_a pour réaliser une oxydoréduction contre un gradient de potentiel redox (PAPAGEORGIOU, 1975). Pour cela, ce complexe est constitué d'un chromophore (Chl_a) et d'un couple donneur-accepteur (Z,Q). Deux théories ont été avancées, rendant compte du fonctionnement du complexe réactionnel PS II :

- Le photorécepteur excité serait un "sensibilisateur" facilitant un échange d'électrons entre Z et Q (DÖRING et al,1969), sans en être le médiateur, selon l'équation :

$$Z\ Chl_a\ Q \xrightarrow{h\nu} Z\ Chl_a^*\ Q \longrightarrow Z^+\ Chl_a\ Q^- \quad (1)$$

- La molécule photoréceptrice (Chl_a) est elle-même oxydée, résultant d'une photoconversion primaire (KAUTSKY et al, 1960 - DUYSENS et SWEERS, 1963), hypothèse qui peut être formulée ainsi :

$$Z\ Chl_a Q \xrightarrow{h\nu} Z\ Chl_a^*\ Q \longrightarrow Z\ Chl_a^+\ Q^- \longrightarrow Z^+\ Chl_a\ Q^- \quad (2)$$

Toutefois, un grand nombre d'arguments a été développé pour infirmer l'hypothèse de la "sensibilisation" : BUTLER (1972) notamment mentionne que des chloroplastes traités au Tris contiennent encore des quantités suffisantes de donneur d'électrons pour qu'une photoréduction de Q soit obtenue ; de plus, l'augmentation de la fluorescence atteint son niveau de rendement maximum lorsque le pool d'oxydants reliant les 2 photosystèmes est bloqué par la DCMU (YAMASHITA et BUTLER, 1968$_a$). Par ailleurs, la cinétique d'augmentation de fluorescence de la Chl_a est trop lente pour rendre compte d'une oxydoréduction photochimique primaire (MAUZERALL, 1972).

Lorsqu'on éclaire brusquement une préparation de matériel photosynthétique adapté à l'obscurité, un certain niveau de fluorescence est atteint très rapidement, appelé fluorescence initiale ou niveau O, selon la nomemclature de LAVOREL (1959). O représente un niveau de fluorescence correspondant à un état physiologique dans lequel tous les intermédiaires reliant les 2 photosystèmes sont oxydés. Nous reviendrons sur l'intérêt de ce niveau initial de fluorescence.

En lumière continue, et à partir du niveau O, l'appareil photosynthétique passe par plusieurs états transitoires, avant d'atteindre un niveau stationnaire. Ces évènements, appelés phénomènes d'induction, ont été tout particulièrement étudiés en ce qui concerne l'évolution de l'O_2 et la fluorescence de la Chl_a.

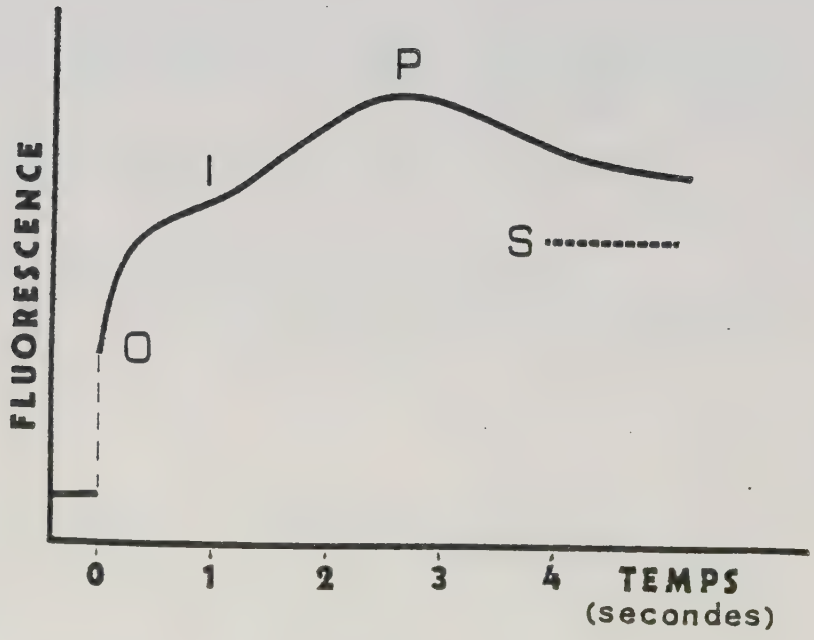


FIGURE 15 - Cinétique d'induction de fluorescence de la chlorophylle a_{II} mesurée sur chlorelles (d'après DELOSME, 1967), montrant les différentes phases OI, IP et PS, selon la terminologie de LAVOREL (1959).

D'une façon désormais classique, l'induction de fluorescence de la Chl_a appelée "effet KAUTSKY" se subdivise en une variation rapide et une variation lente. Durant l'augmentation rapide de la fluorescence, on distingue une montée OI atteignant un premier plateau transitoire (Fig. 15). Cette montée est pratiquement synchrone avec la cinétique d'évolution de l'O_2 et est appelée "phase d'activation" (JOLIOT, 1965). Ensuite, on observe un plateau transitoire ou une légère décroissance de fluorescence en fonction du degré d'anaérobiose : ce "plateau" a été attribué à l'oxydation d'un pool intermédiaire et de Q par PS I (MUNDAY et GOVINDJEE, 1969). La fluorescence augmente de nouveau jusqu'à un deuxième niveau transitoire P (Fig. 15), processus synchrone avec la décroissance du taux de dégagement d'O_2 (DELOSME et al, 1959 - JOLIOT, 1968) et qui rend compte de la majeure partie de la fluorescence variable.

Pour expliquer la montée rapide de fluorescence, DUYSENS et SWEERS (1963) émettent l'hypothèse de la présence d'un transport d'électrons, Q agissant comme accepteur d'électrons du PS II. Lorsque Q est oxydé, il est supposé être un "Quencher" de l'excitation piégée dans le centre réactionnel, dans la mesure où celui-ci utilise cette énergie pour soustraire un électron du donneur primaire. Lorsque Q est réduit, celui-ci n'est plus quencher de fluorescence.

Selon l'hypothèse de DUYSENS et SWEERS, l'amplitude de P-O mesure indirectement la différence de potentiel redox liée au couple Q/Q^- ; la relation entre réduction de Q et l'amplitude de P-O n'est toutefois pas linéaire (LAVOREL, 1959). Lorsque la DCMU est ajoutée à du matériel photosynthétique adapté à l'obscurité, on obtient :

$$Z\ Ch\ Q\ \ A \xrightarrow{DCMU} Z\ Chl\ Q//\ A \xrightarrow{h\nu} Z^+\ Ch\ Q^-\ //\ \ A \qquad (3)$$

Le signe // indique une "rupture de la liaison" entre Q^- et le pool A ; Q^- n'étant plus quencher, le niveau de fluorescence de chlorophylle a est considérablement augmenté.

DUYSENS et SWEERS montrent que DCMU n'empêche pas la réduction de Q par PS II, mais sa réoxydation par le PS I, hypothèse supportée par LAVOREL (1966) et YAMASHITA et BUTLER (1968). Nous verrons ultérieurement que l'action de DCMU ne se situe pas exactement au niveau de Q, mais d'un accepteur secondaire.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'aspect qualitatif et quantitatif des effets des divers inhibiteurs comparés à DCMU sur la montée rapide de fluorescence. La décroissance rapide jusqu'à l'état quasi-stationnaire S ne nous préoccupera que sur un plan qualitatif.

2 - MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

2.1.1. Algues

La souche d'algues *(Chlorella pyrenoïdosa chick)* provient du Service de Radioagronomie - C.E.N. de Cadarache.
La culture est réalisée dans une colonne de verre de 50 mm x 450 mm, munie à sa partie inférieure d'un verre fritté, au travers duquel passe de l'air comprimé filtré sur Millipore, à raison de 4 m3 par heure, et enrichi en CO_2 à 3 %.
Le milieu de culture stérilisé est constitué de :

.. / ..

A - Milieu de TAMIYA modifié

$K N O_3$: 2,5 g/litre

$Mg SO_4 7 H_2 O$: 2,5 g/litre

$K H_2 PO_4$: 1,25g/litre

complexe EDTA-Fer (Titriplex) 22,7 mg/l

B - Solution d'ARNON

a) solution concentrée A_5 en g/litre :

$H B O_3$: 2,86

$Cl_2 Mn, 4 H_2 O$: 1,81

$SO_4 Zn, 7 H_2 O$: 0,222

$SO Cu, 5 H_2 O$: 0,079

$MO O_3$ 100 % : 0,015

b) solution concentrée B_6 en mg/litre :

$N H_4 VO_3$: 94,02

$(SO_4)_2 Cr K, 12 H_2 O$: 44,76

$SO_4 Ni , 6 H_2 O$: 49,38

$(NO_3)_2 CO , 6 H_2 O$: 17,94

$Na_2 WO_4 , 2 H_2 O$: 48,4

$Ti O SO_4 , 4 H_2 O$

Ajouter 1 ml de solution A_5 et 1 ml de solution B_6 par litre de milieu ; ajuster le pH à 5,4 avec de la potasse.

Les algues sont "repiquées" chaque début de semaine d'une façon très diluée, dans du milieu neuf. Elles sont diluées quotidiennement avec du nouveau milieu dans un rapport de volume de 1/3 à 1/2. Le cylindre contenant la suspension de chlorelles est immergé dans un bain thermostaté à 27°C et éclairés avec une lampe froide MAZDA PAR F-EXT de 150 W (photopériode 15 h) délivrant une densité de flux radiant de 250 W/m2.

2.1.2. Détermination de la concentration en chlorophylle des algues

Le comptage numérique des algues étant peu commode, la concentration en algues est déterminée par la mesure de leur teneur en chlorophylle. Pour cela, 0,5 ml de suspension de chlorelles sont prélevés, auxquels on ajoute 0,5 ml d'eau, puis 4 ml de pyridine pour analyse. La suspension est agitée vigoureusement, laissée environ 10 minutes à l'obscurité et centrifugée ; la densité du surnageant est mesurée à 670 et 655 nm. Les concentrations en chlorophylle sont données par les formules :

$$Chl_a \ (\gamma/ml) = (13,66 \times D.O_{670}) - (5,03 \times D.O_{655})$$

$$Chl_b \ (\gamma/ml) = (25,3 \times D.O_{655}) - (8,80 \times D.O_{670})$$

$$Chl \text{ totale} = (4,86 \times D.O_{670}) + (20,3 \times D.O_{655})$$

2.1.3. Chloroplastes

Ils sont extraits et mis en suspension, tel que cela est décrit dans le chapitre II paragraphe 1.2.1. (première partie).

2.2. Equipement

Le montage destiné à la mesure de la fluorescence de la Chl_a en lumière continue a été réalisé d'une façon similaire à celui de JOLIOT. La lumière émise par une lampe à iode SYLVANIA BRL 50 W, 12 volts, alimentée par une alimentation stabilisée (Lambda Electronics Melville L.C, N.Y) est focalisée par différentes lentilles et filtrée par un filtre actinique bleu Schott BG-38 éliminant le rouge et l'infrarouge. Le faisceau actinique traverse ensuite une cellule en verre aux parois strictement parallèles, (trajet optique 6 mm) et contenant environ 2 ml de suspension. L'intensité de la fluorescence de la suspension est mesurée par un photomultiplicateur EMI 9558 QB, à couche s-20, placé dans l'axe optique de la source lumineuse, après passage au travers d'un filtre rouge non fluorescent Corning CS-2-64 et d'un filtre WRATTEN 97 laissant passer la lumière d'une longueur d'onde supérieure à 660 nm. Le PM est alimenté par une alimentation stabilisée CRC-ALS 349, les tensions appliquées étant habituellement de l'ordre de 500 à 700 Volts. Le signal du PM est appliqué directement à l'entrée du module d'amplification 5 A 18 N double, intégré à un oscilloscope à mémoire TEXTRONIK 5115 équipé d'un base de temps double 5 B 12 N.
La cellule contenant la suspension de matériel photosynthétique est éclairée brusquement par l'abaissement d'un obturateur-drapeau, l'ouverture s'effectuant en 500 µsec environ (Fig.16).
L'image obtenue sur l'écran de l'oscilloscope est photographiée à l'aide d'un appareil POLAROID.
La lumière d'excitation délivre un flux photonique moyen équivalent à 85 µEinstein/$m^{-2}sec.^{-1}$

2.3. Essais

La suspension d'algues est reprise dans du milieu de croissance frais, diluée de sorte que la concentration en chlorophylle soit toujours inférieure à 100 γ/ml, et ceci pour deux raisons :

- l'appauvrissement en oxygène reste négligeable compte-tenu de la la courte durée de séjour dans la cellule de mesure (DELOSME, 1967)
- l'utilisation directe de cette suspension, dont la concentration en algues est faible, permet un éclairement constant et homogène de la cellule (DELOSME, 1967).

Les algues sont laissées à l'obscurité totale et maintenues en aérobiose par barbotage d'air comprimé délivré par une petite pompe.
2 ml de cette suspension sont pipettés et placés dans la cuvette de mesure, auxquels sont ajoutés les différents inhibiteurs aux concentrations voulues, de sorte que la teneur finale en éthanol n'excède pas 1 %.

Dans le cas des chloroplastes, ceux-ci sont conservés à l'obscurité en suspension concentrée, au bain de glace et dilués dans le tampon Tris-HCl 0.05M pH 8, NaCl 0.01M, $MgCl_2$ 0.01 M au fur et à mesure des besoins.
Aucune aération de la suspension de chloroplastes n'est cependant effectué.

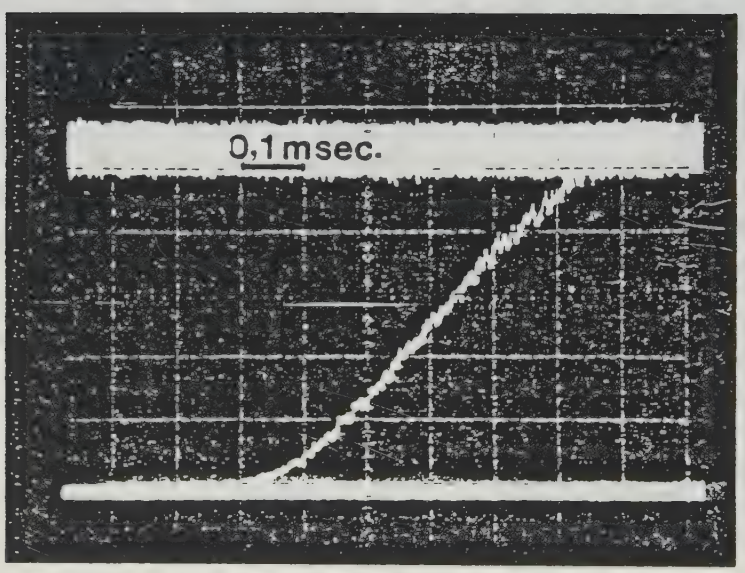


FIGURE 16 - Image polaroïd de l'écran de l'oscilloscope montrant l'ouverture de l'obturateur (*vitesse de balayage 100 µs/division*)

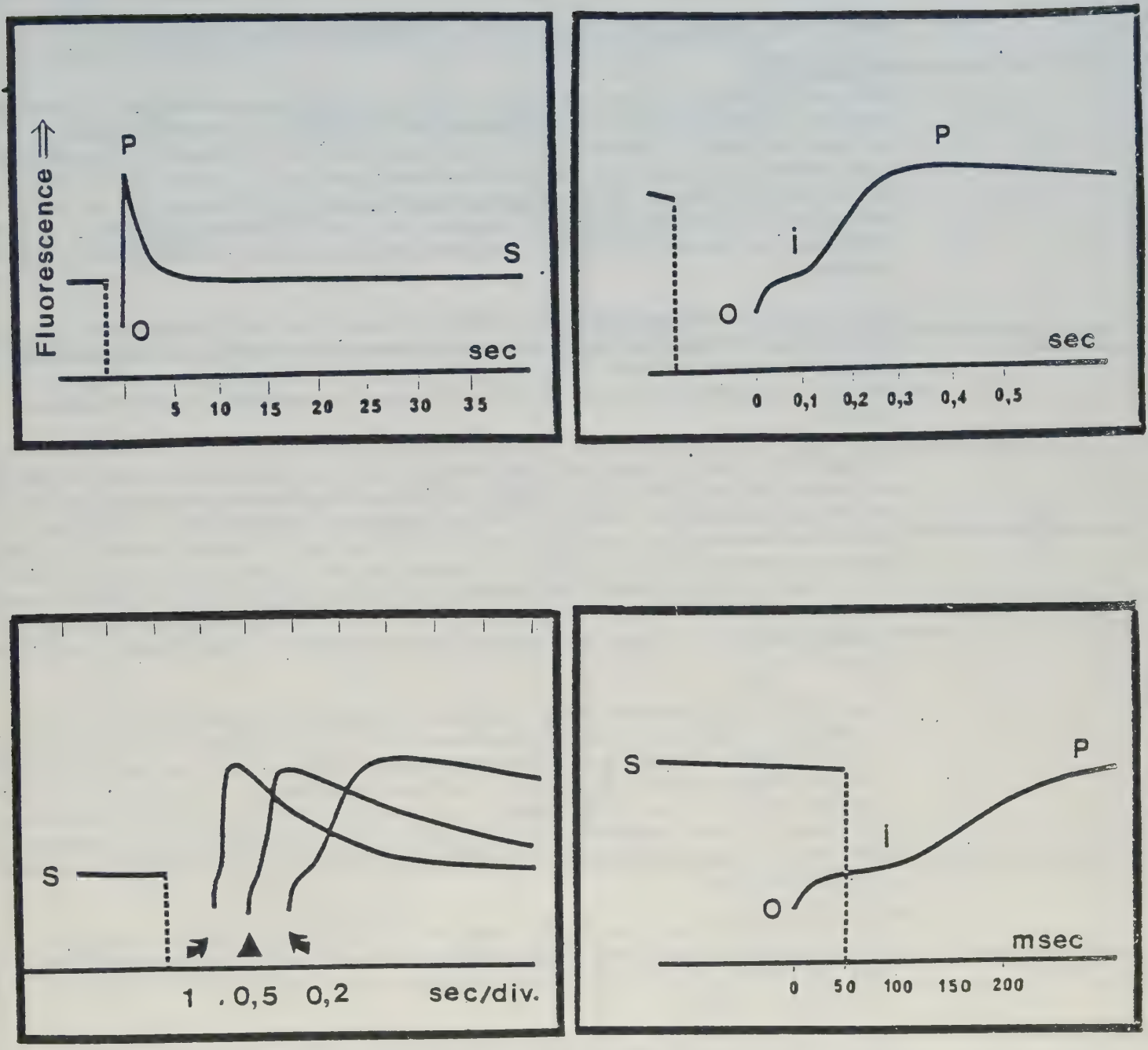


FIGURE 17 - Reproduction des courbes de cinétiques d'induction de fluorescence de chlorelles adaptées à l'obscurité, à diverses vitesses de balayage *(concentration en chlorophylle 30 γ/ml, flux photonique d'excitation : 85 μEinstein/m^{-2}/sec^{-1})*

3 - RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Chlorelles

3.1.1. Comparaison qualitatitve des divers inhibiteurs sur l'induction de fluorescence

Nous avons vérifié, dans un premier temps l'existence, dans les chlorelles adaptées à l'obscurité, en aérobiose, la présence des diverses phases mentionnées dans l'introduction de ce chapitre. En l'absence d'inhibiteur, nous retrouvons (Fig. 17) la fluorescence initiale O, la montée OI et le niveau transitoire P, ainsi que la fluorescence stationnaire S, et ceci en faisant varier les temps de balayage de l'oscilloscope de 50 msec à 1 sec/division. Le retour à la ligne de base est obtenu par fermeture de l'obturateur.

Compte tenu du nombre élevé de courbes d'induction de fluorescence obtenues en présence de tous les inhibiteurs qui ont été testés sur les réactions photochimiques (Chapitre II), nous ne présenterons ici que l'effet d'une substance par famille chimique, considérée comme représentative.

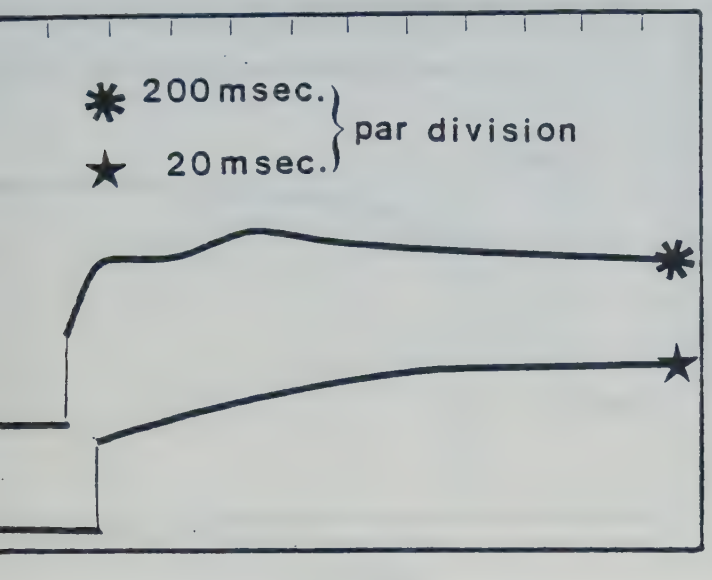
La figure 18 montre les résultats obtenus par les inhibiteurs mentionnés, à une concentration finale de 10^{-4} M à 10^{-7} M sur des chlorelles adaptées à l'obscurité, en comparaison avec un témoin contenant uniquement de l'éthanol à 1 %. Deux vitesses de balayage sont utilisées, afin d'avoir aussi bien une image d'ensemble de la cinétique d'induction de fluorescence qu'une idée plus précise de la phase d'activation. Pour cela, les vitesses de 200 msec. et 20 msec/division sont utilisées. D'un point de vue purement qualitatif, il est possible de tirer les conclusions suivantes, à partir des cinétiques obtenues :

- Les inhibiteurs peuvent être classés en 2 groupes : ceux présentant une cinétique d'induction de fluorescence de la Chl_a similaire à celle observée avec la DCMU : c'est le cas des *N-phénylcarbamates, des acylanilides, des hydroxy-benzonitriles halogénés, des urées cyclisées, des pyridazinones, des s-triazines, des triazinones, des uraciles et des 1,2,4-thiadiazoles.* Par contre, nous observons un 2ème groupe de structures qui ne changent pas de façon notable ces cinétiques : il s'agit des *diphényléthers* et des *dinitroanilines*.

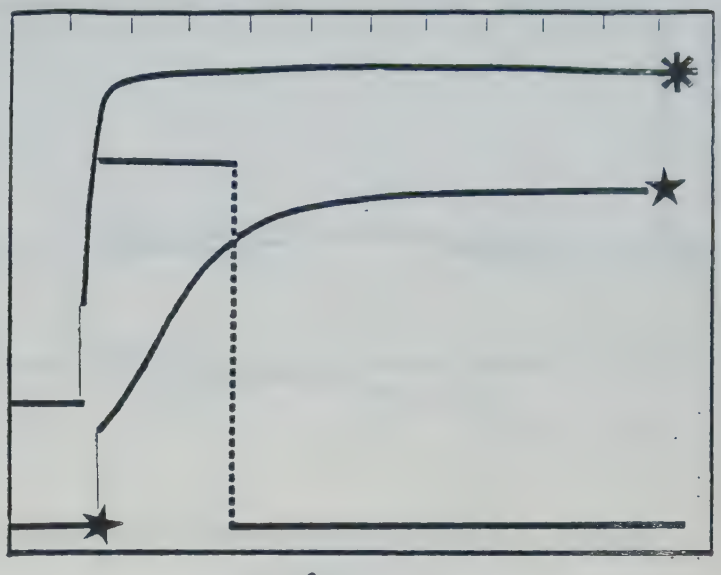
  En d'autres termes, les inhibiteurs du 1er groupe agiraient comme la DCMU, c'est-à-dire que l'oxydation de Q par le pool de PQ est inhibée ; les substances du 2ème groupe ne semblent pas avoir un site d'action identique à DCMU.

- Les influences des inhibiteurs "type-DCMU" sur les cinétiques de fluorescence ne sont pas visuellement dissociables les unes des autres : comparés au témoin, tous les produits de ce groupe stimulent très fortement le niveau de fluorescence maximale, ils accélèrent de façon très importante la montée de fluorescence durant la phase d'activation et comme cela avait été suggéré par JOLIOT et JOLIOT (1964), DELOSME (1967) et suppriment la phase thermique, principalement aux fortes concentrations en inhibiteurs.

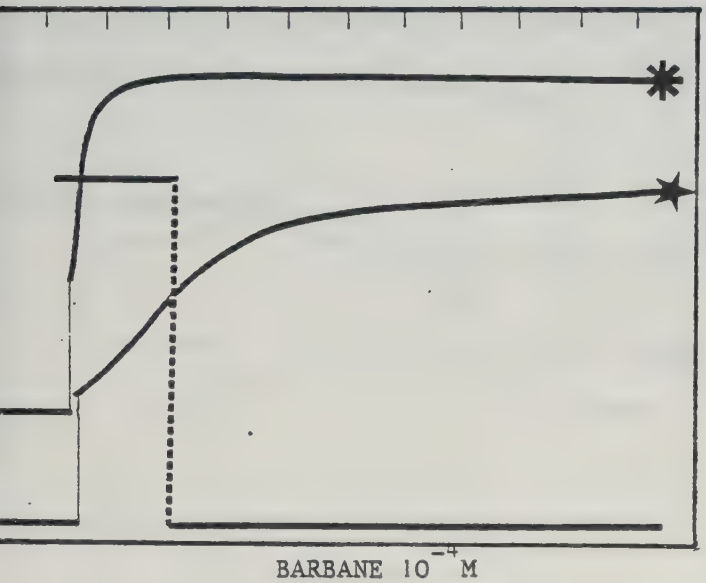
FIGURE 18 : Induction de fluorescence en lumière continue, mesurée en présence d'inhibiteurs de photosynthèse sur chlorelles (30^{γ} *chlorophylle/ml, flux photonique d'excitation : 85 µEinstein* m^{2}/sec^{-1})



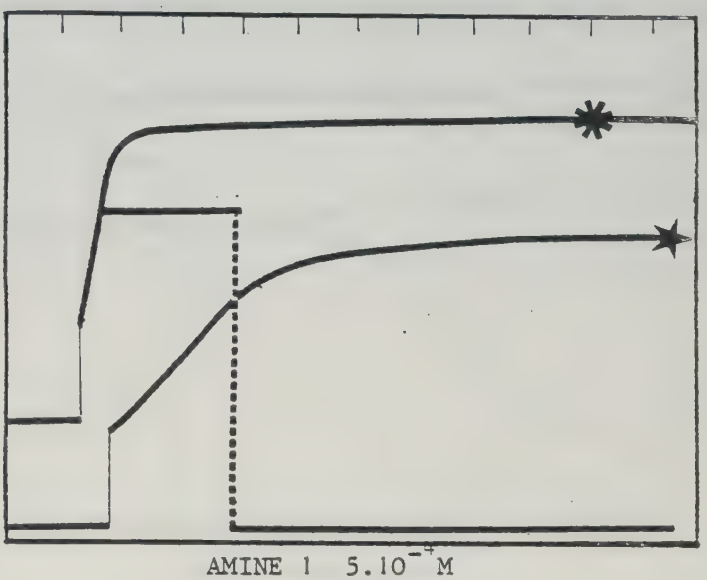
TEMOIN



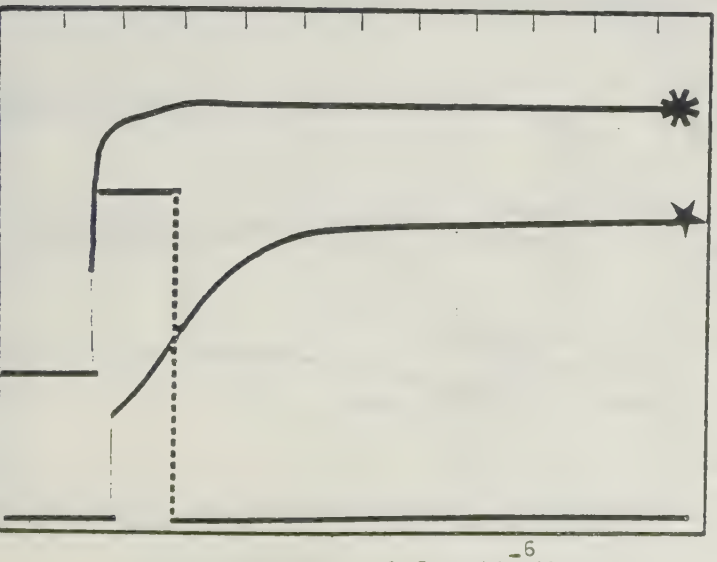
DCMU 5.10^{-6} M (N-phénylurée)



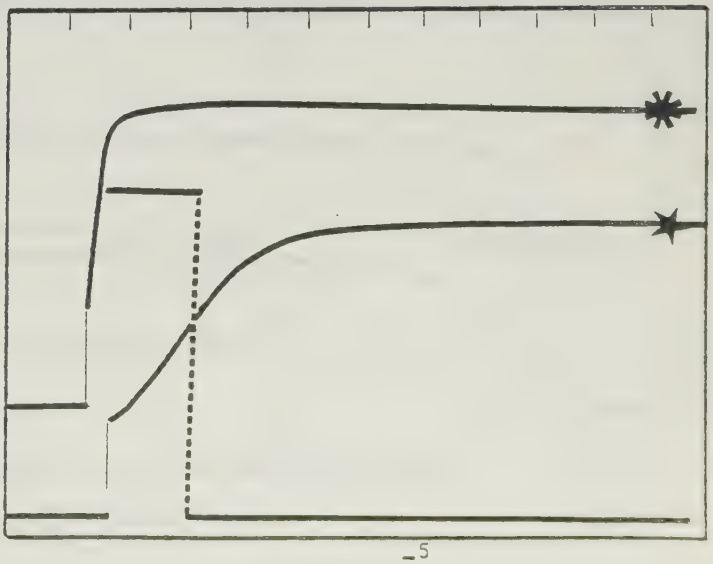
BARBANE 10^{-4} M
(N-phénylcarbamate)



AMINE 1 5.10^{-4} M
(diphénylamine)

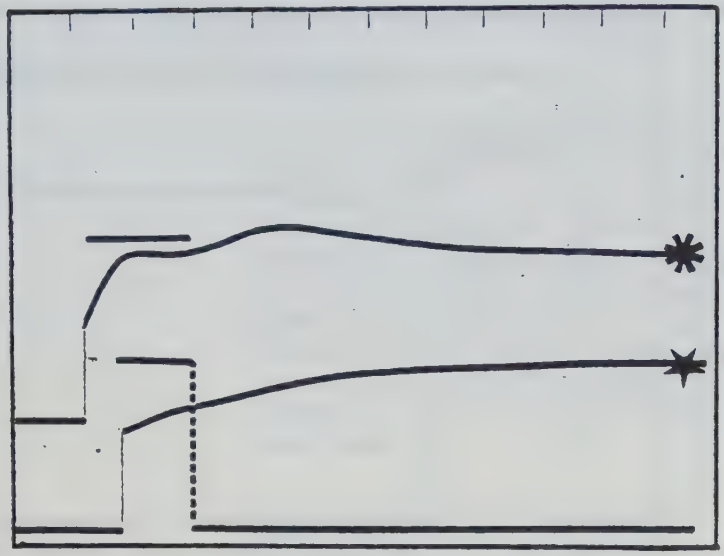


PROPANIL $2,5 . 10^{-6}$ M
(N-acylanilide)

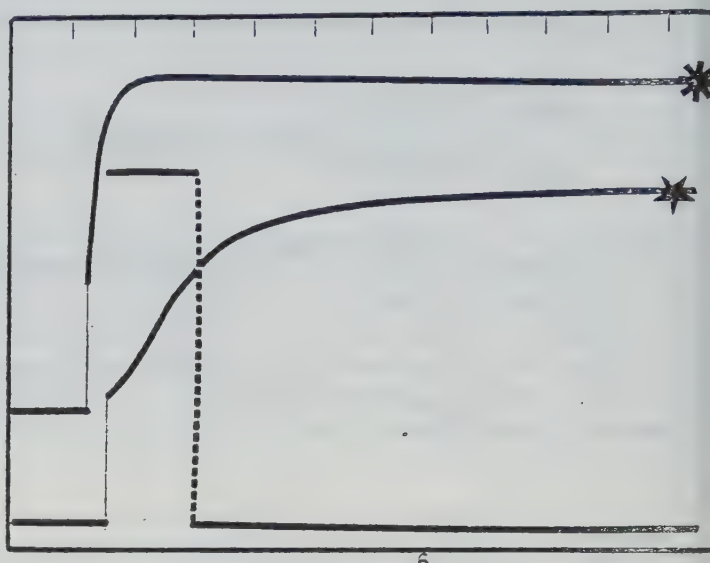


SIMAZINE 10^{-5} M
(s-triazine)

FIGURE 18 : Induction de fluorescence en lumière continue, mesurée en présence d'inhibiteurs de photosynthèse sur chlorelles (30^{γ} *chlorophylle/m*
(suite) *flux photonique d'excitation : 85 µEinstein* m^2/sec^{-1})

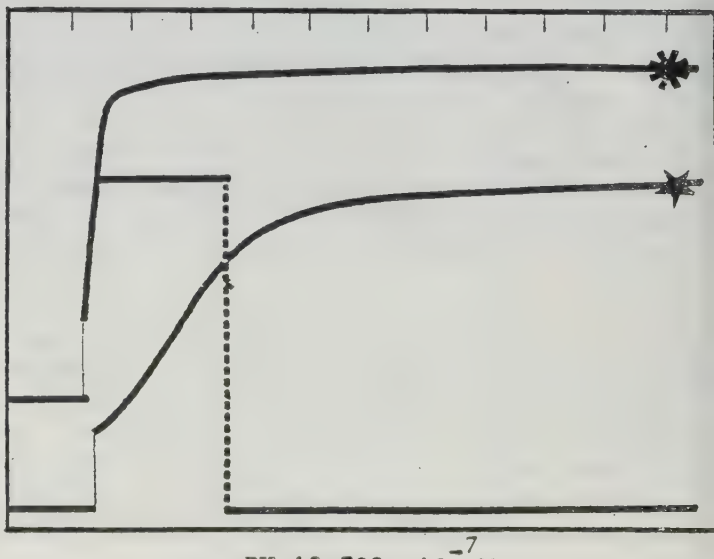


TÉMOIN

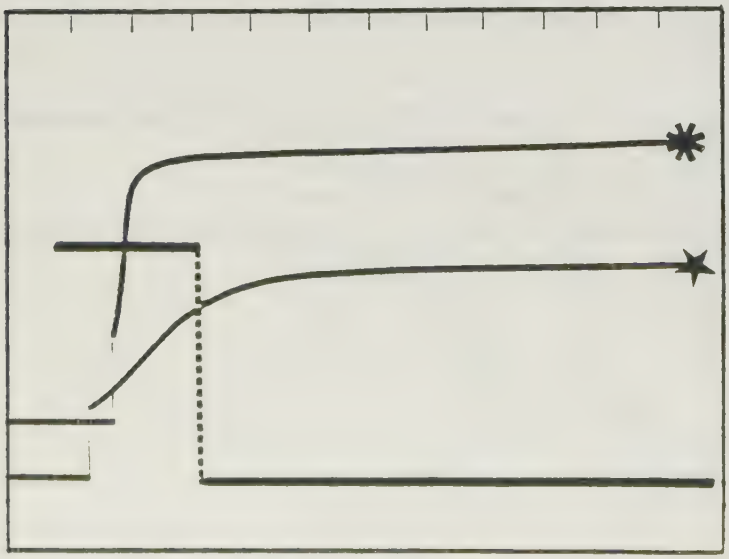


IOXYNIL 10^{-6} M
(hydroxybenzonitrile halogéné)

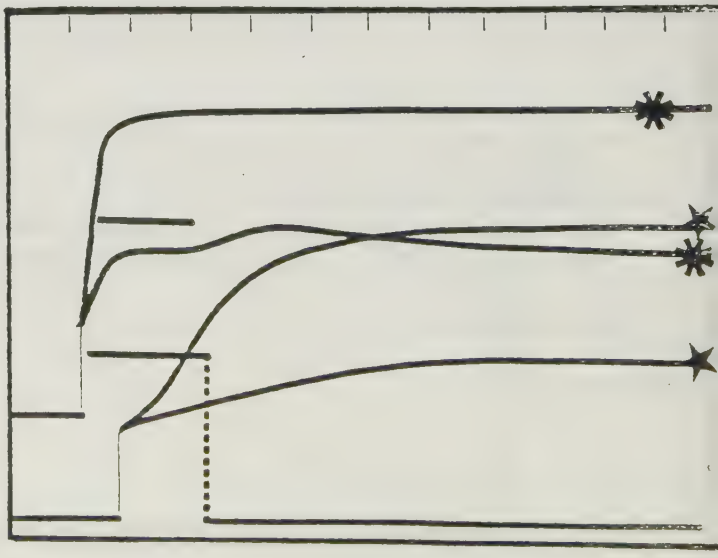
RU 15.086 10^{-4} M
(phénylurée cyclisée)



RU 12.709 10^{-7} M
(Uracile)



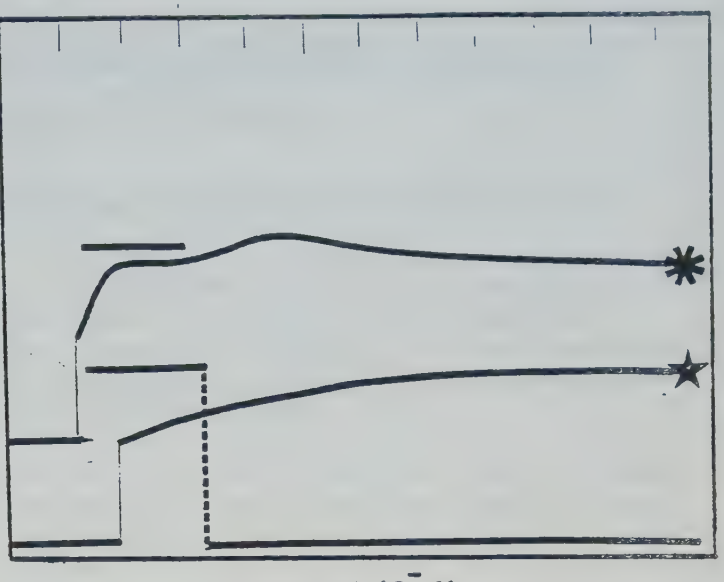
PYRAMINE 10^{-6} M
(Pyridazinone)



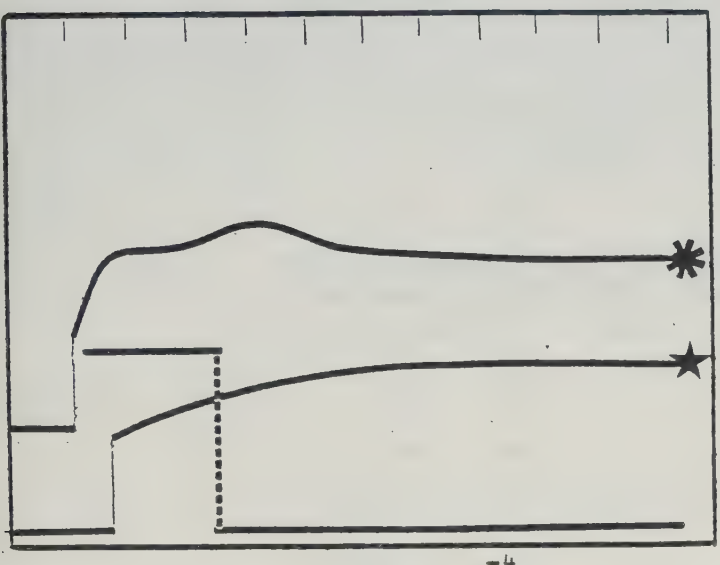
METRIBUZIN 5.10^{-7} M + TEMOIN
(Triazinone)

FIGURE 18 Induction de fluorescence en lumière continue, mesurée en présence d'inhibiteurs de photosynthèse sur chlorelles (30^{γ} *chlorophylle/ml, flux photonique d'excitation : 85 µEinstein m^2/sec^{-1}*)

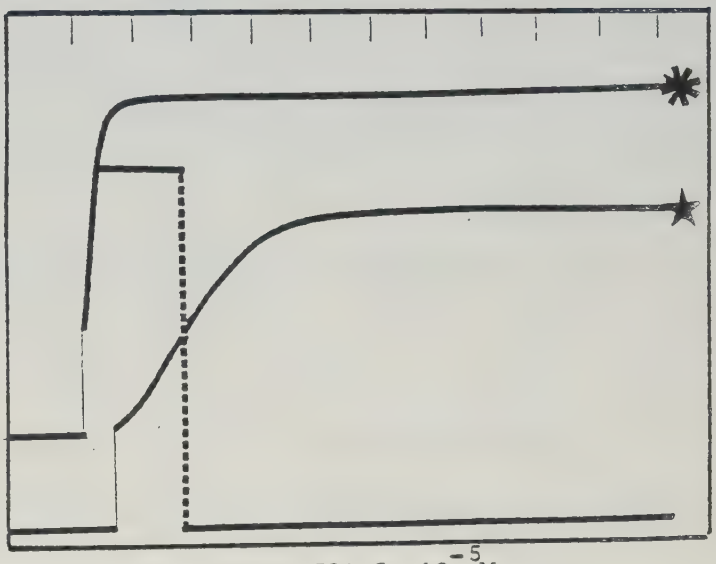
TEMOIN



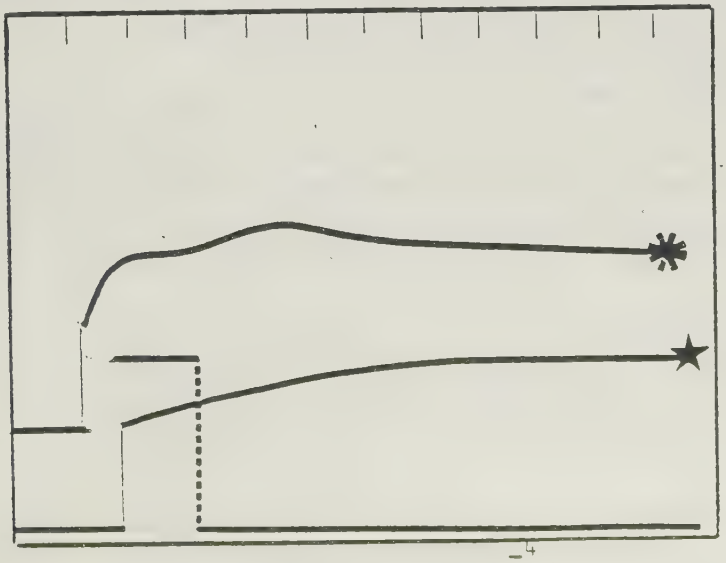
CREDAZINE 10^{-} M
(Phénoxypyrazine)



NITROFENE 10^{-4} M
(Diphényléther)



RU 21.731 5. 10^{-5} M
(Thiadiazoline)



TRIFLURALINE 10^{-4} M
(Dinitroaniline)

3.1.2. Recherche d'une relation dose-effet entre concentration en inhibiteurs et certains paramètres cinétiques de fluorescence

3.1.2.1. Vérification du caractère sigmoïdal de l'induction de fluorescence en présence d'inhibiteurs

Le modèle proposé par JOLIOT et JOLIOT (1964) prédit qu'en présence de DCMU, il y a migration d'énergie entre les unités photosynthétiques, se caractérisant par une courbe d'induction sigmoïdale. Cette observation faite sur algues se vérifie sur chloroplastes isolés, comme l'ont montré de nombreux auteurs (voir DELOSME, 1967 - HIPKINS, 1978).

Pour vérifier ce modèle, nous avons choisi des conditions dans lesquelles il est possible d'observer d'une manière précise la phase photochimique (vitesse de balayage rapide, concentration élevée en inhibiteur, obtention de la valeur de fluorescence maximale).

L'allure sigmoïdale des cinétiques de fluorescence obtenues suggère fortement que la courbe observée corresponde à l'intégrale de la loi normale, de forme :

$$P = \frac{1}{2\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\alpha + \beta x} \exp\left(-\frac{1}{2}u^2\right) du \qquad (4)$$

dans laquelle P est la probabilité de réponse à une variable x, u la variable de l'intégrale exprimée par :

$$u = \frac{x - m}{\sigma}$$

où m est la médiane de la distribution et σ la déviation standard.

L'équation (4) n'étant pas intégrable, on peut définir dans un cas général la variation équivalente Y à une loi normale en utilisant les tables de "probit"; par suite on a :

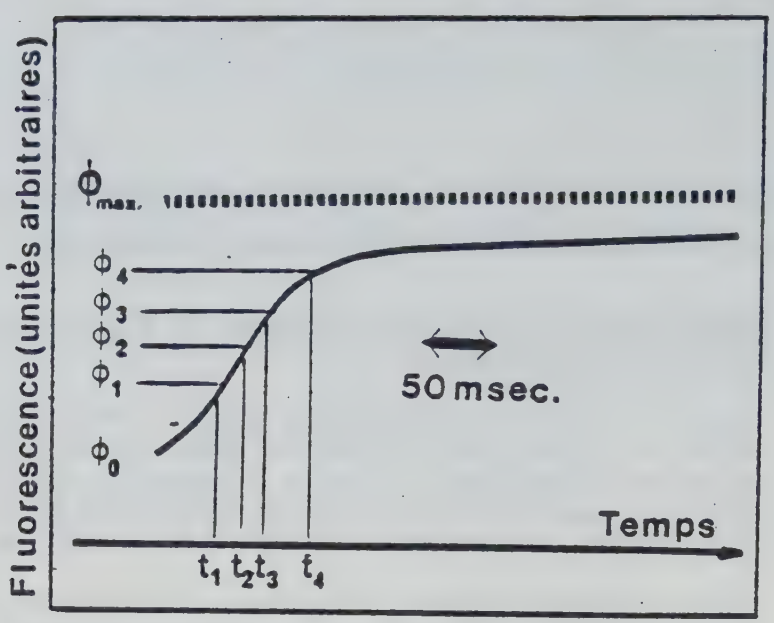
$$\text{probit } P = Y + 5 = \alpha + \beta x \qquad (5)$$

Le terme "probit" provient d'une contraction de "probabilité unit" (BLISS, 1934).
L'utilisation de la méthode "probit" doit par suite permettre de déterminer la forme mathématique du phénomène observé (FINNEY, 1962).

Il existe un moyen simple de vérifier si les valeurs expérimentales correspondent à l'équation (6) :

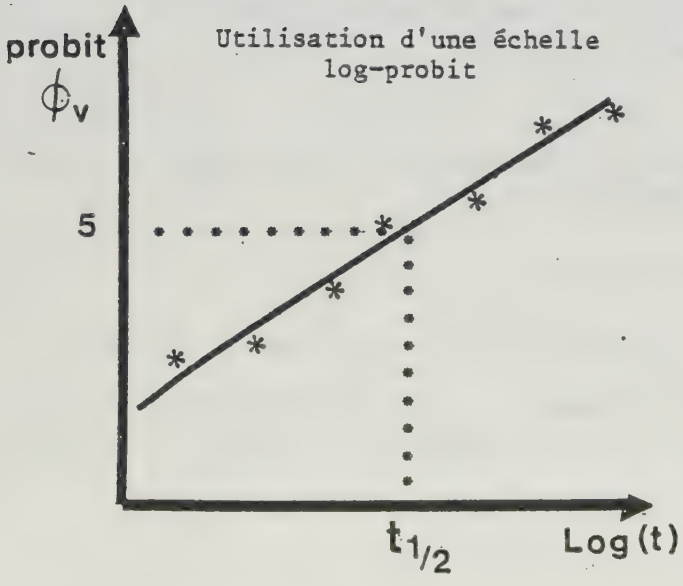
- soit en transformant les valeurs de $\Delta\phi_v$ en pourcentages par rapport à ϕ max = 100 %, tandis que les valeurs de t sont converties en log, et portées sur un graphique ; un résultat identique peut être évidemment obtenu en utilisant un papier graphique à échelle log-probit, ce qui revient dans les deux cas à transformer la sigmoïde en droite,
- soit en utilisant une analyse de régression linéaire à partir des valeurs probits des pourcentages de $\Delta\phi_v$ et le log de t, ce qui permet d'obtenir l'équation de la droite obtenue et surtout l'ajustement à la droite théorique :

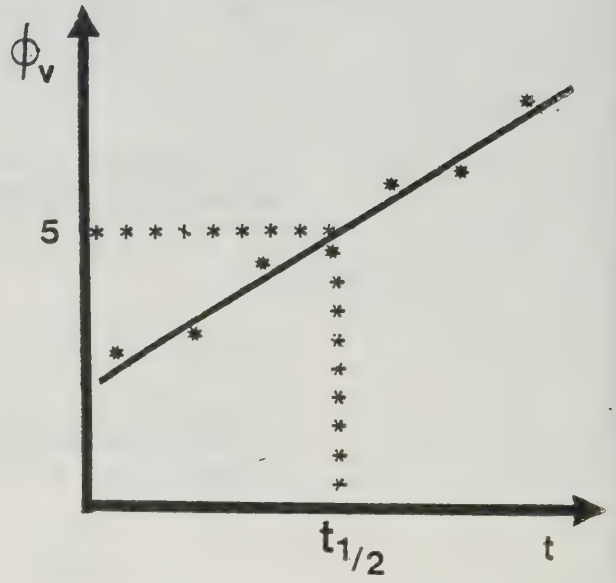
$$\text{probit } \Phi_v = \alpha + \beta t \qquad (6)$$



Calcul de Pourçentages

Calcul de probit
ϕ_v = (log t)





LINEAR REGRESSION ANALYSIS

ATRAZINE

X = log t

Y = probit fluorescence

VAR OBS	X	Y
1	.531	4.495
2	.681	4.902
3	.748	5.095
4	.806	5.292

VAR	MEAN	STD DEV
X	.691500000	.118565031
Y	4.946000000	.340222476

PAR	REGRESSION COEFFICIENT	STD ERROR REG COEFF	COMPUTED T VALUE	CONFIDENCE LIMITS LOWER	UPPER
BO	2.963912064	.066350907	44.670256902	2.833864286	3.093959842
B1	2.366359993	.094911493	30.200346500	2.680333465	3.052386520

CORRELATION	.998905381
F VALUE	912.060928770
STD ERROR	.010491086

ANOVAR	DF	SUM OF SQUARES	MEAN SQUARE
REGRESSION	1	.346494195	
RESIDUALS	2	.000759804	.000379902
TOTAL	3	.347254000	

FIGURE 19 : Transformation des valeurs d'intensité de fluorescence en présence de 10 µmoles d'Atrazine en une droite par la méthode "log-probit" (ϕ_0 = 0, ϕ_{max} = 100 %)

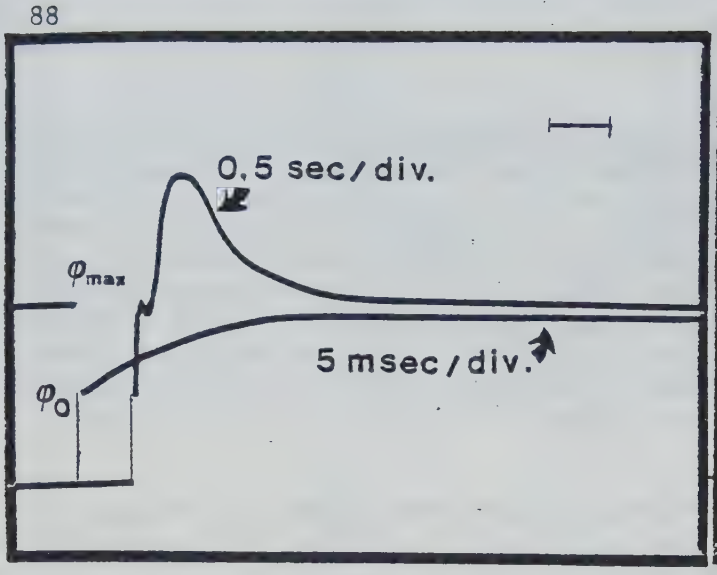
A titre d'exemple, la figure 19 montre la cinétique d'induction de fluorescence obtenue avec l'Atrazine à 10^{-5}M, à une vitesse de balayage de 50 msec/division (Fig. 19-a), la transformation de ϕ_{v1}, ϕ_{v2} et de t_1, t_2 ... etc ... en leurs valeurs "probit" et "log" respectivement, par utilisation d'un papier à échelle log-probit (Fig. 19-b) ou par utilisation de tables et construction de la droite sur papier à échelles arithmétiques (Fig. 19-c), ainsi que l'analyse de régression linéaire obtenue à partir de ces valeurs (Fig. 19-d). Il en ressort que la sigmoïde obtenue est parfaitement assimilable à une droite du type probit ϕ_v = 2,96 + 2,86 t et que le coefficient de corrélation entre les droites théorique et expérimentale est excellent (r = 0,998).

NOTE : L'expression mathématique de l'intégrale de la loi normale représente une fonction variant de $-\infty$ à ∞; expérimentalement, la montée de fluorescence est observée entre deux valeurs définie ϕ_0 et ϕmax, ce qui revient à dire que la sigmoïde observée ne correspond sans doute qu'à une fraction définie de l'ensemble de la distribution, tout au moins entre ϕ_0 et ∞. La limite supérieure ϕmax est obtenue expérimentalement alors que théoriquement, la fluorescence doit atteindre une valeur asymptotique de ϕmax. Dans ces conditions, il est possible que l'excellente corrélation entre courbes observée et théorique soit valable pour la majeure partie de la phase rapide de montée de fluorescence, mais que la phase lente ne fasse plus partie de la même fonction : il est impossible de décider *a priori* quelle alternative choisir sans une analyse mathématique plus complète du problème.

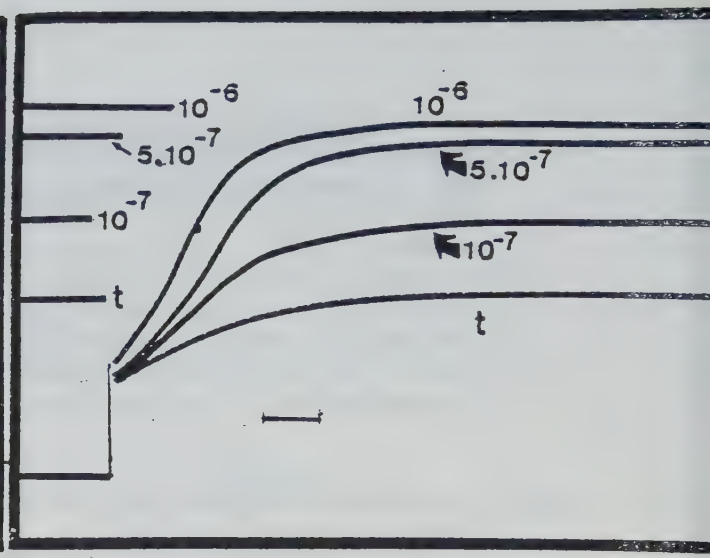
TABLEAU 8

Coefficients de corrélations obtenues entre droites théorique et expérimentale de la relation entre le probit de ϕ_v et le log de t pour un représentant de chaque famille chimique d'inhibiteurs du "type DCMU"

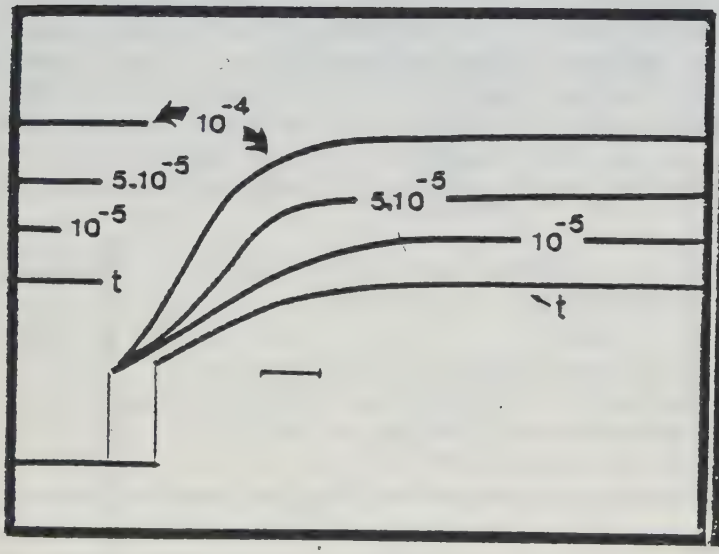
Nom	Famille	Concentration finale	Coefficients de corrélation (r)
DCMU	Phénylurée	10^{-6} M	0,997
Barbane	N-phényle-carbamate	10^{-4} M	0,992
Propanil	N-acylanilide	10^{-5} M	0,992
Atrazine	s-triazines	10^{-5} M	0,998
Ioxynil	Benzonitrile	10^{-6} M	0,997
Lénacile	Uracile	10^{-6} M	0,993
RU 15.086	Urée cyclisée	10^{-4} M	0,985
Pyramine	Pyridazinone	10^{-5} M	0,991
Metribuzin	Triazinone	10^{-6} M	0,998
RU 21.731	1,2,4-Thiadiazole	10^{-5} M	0,997



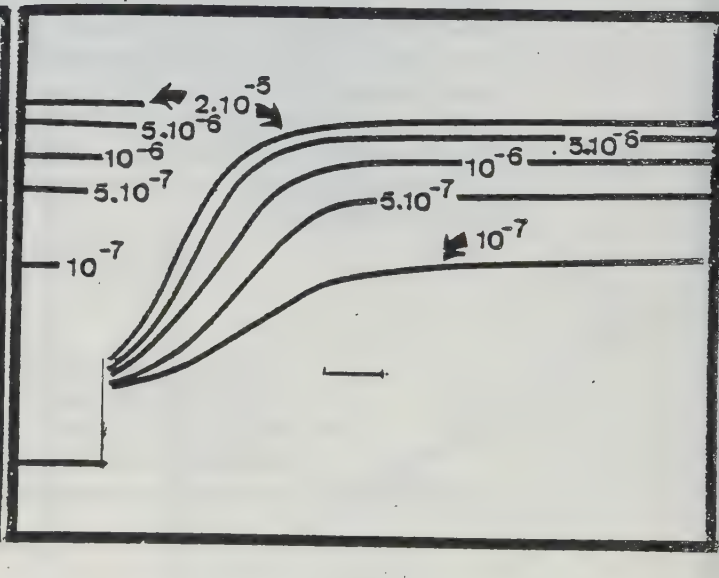
TEMOIN



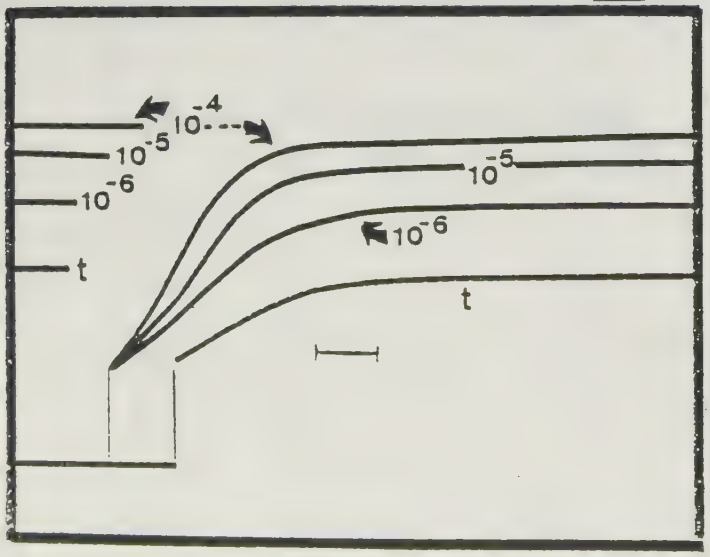
D.C.M.U.



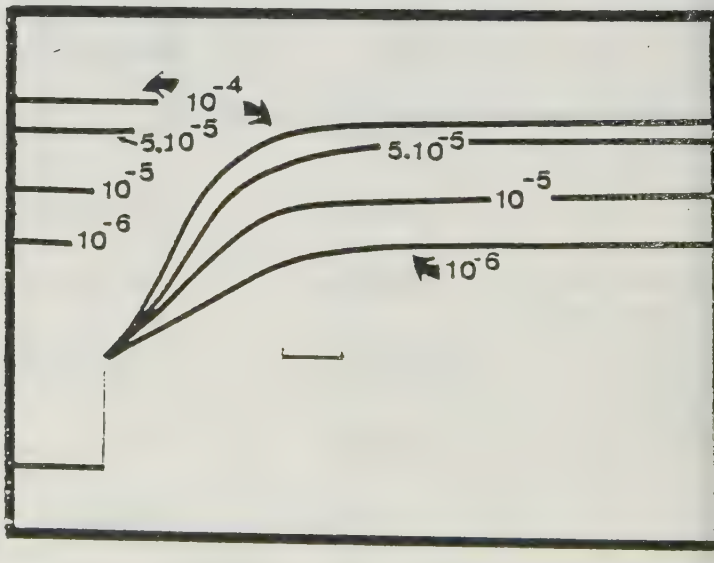
BARBANE



IOXYNIL

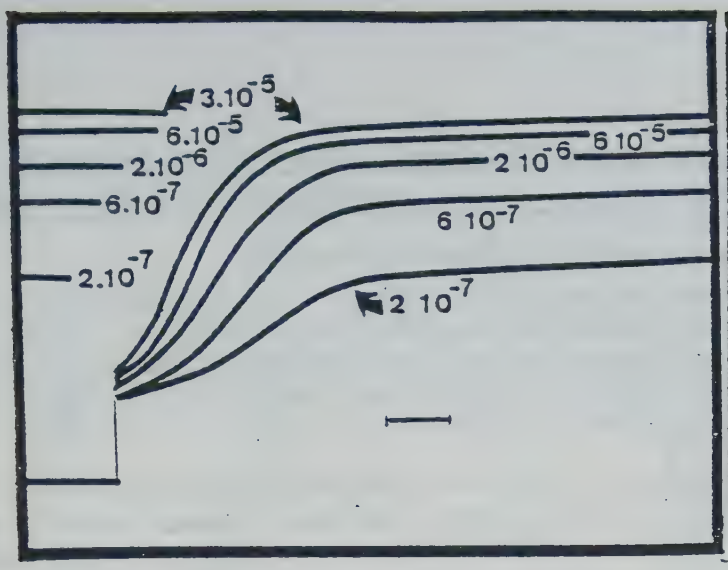


ATRAZINE

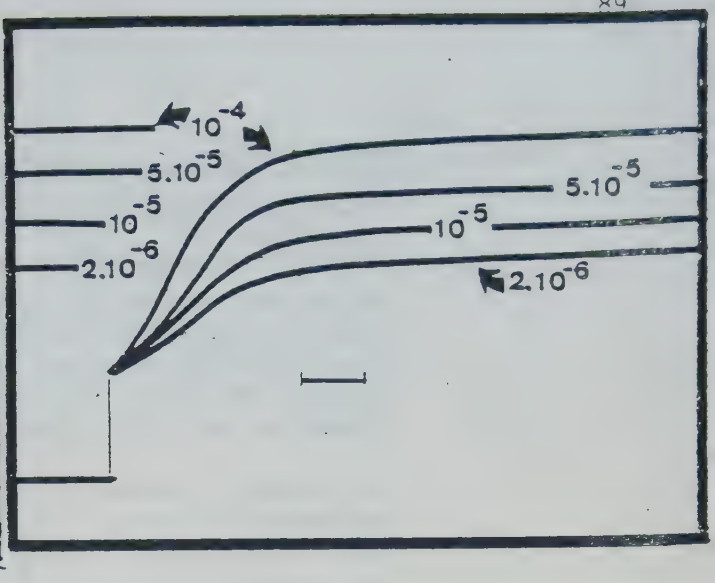


PROPANIL

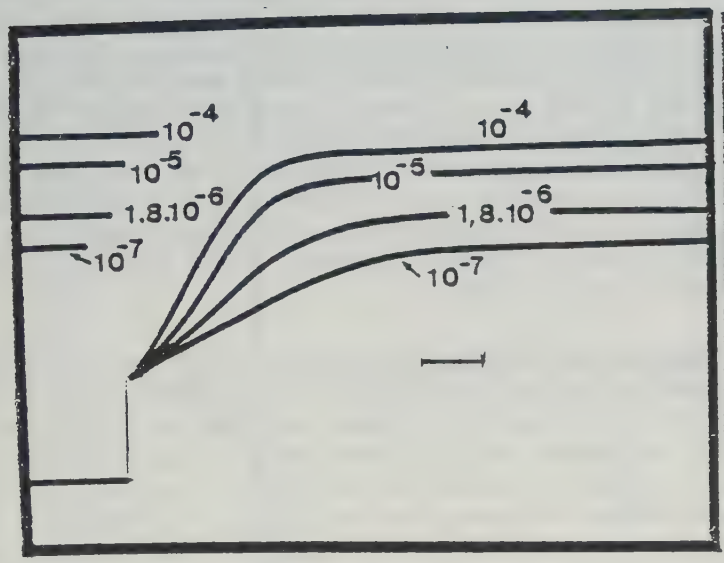
FIG. 20 - Effet de différentes concentrations en inhibiteurs de photosynthèse sur la cinétique d'induction de fluorescence mesurée sur chlorelles (vitesse de balayage 5 msec/division, sauf indication contraire ; conditions expérimentales identiques à la Fig. 18) ; les concentrations sont indiquées en moles.



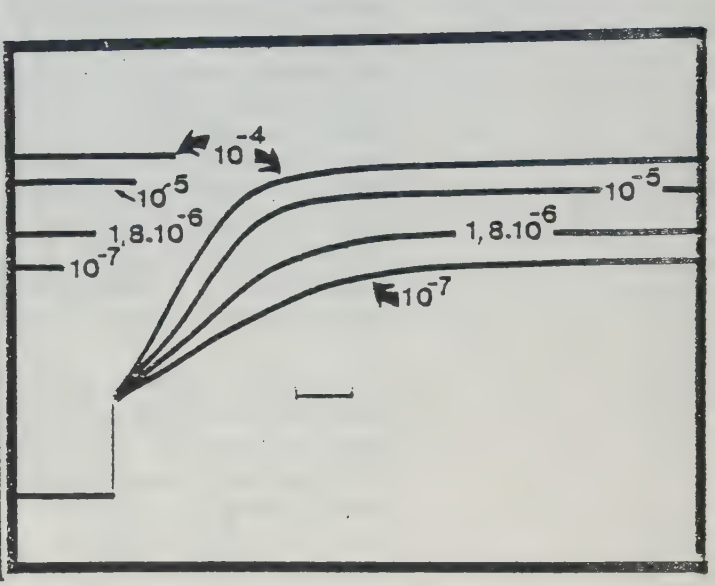
METRIBUZIN



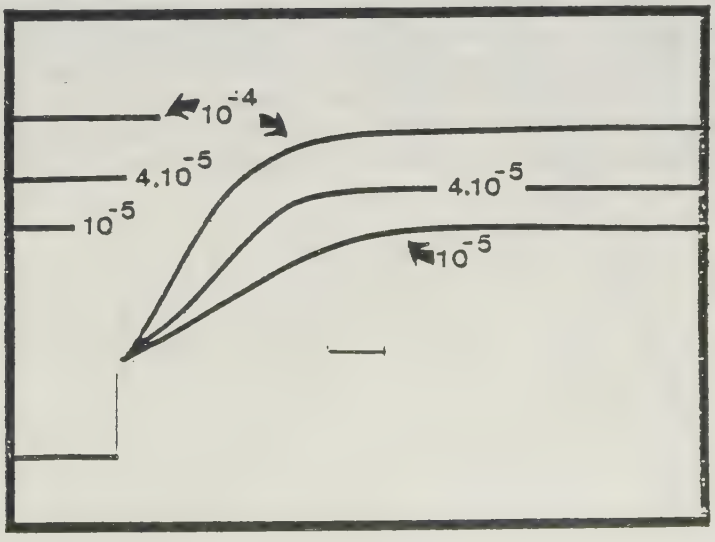
PYRAMINE



LENACILE



RU 21.731



RU 15.086

FIG. 21 - Effet de différentes concentrations en inhibiteurs de photosynthèse sur la cinétique d'induction de fluorescence mesurée sur chlorelles (vitesse de balayage 5 msec/division, sauf indication contraire ; conditions expérimentales identiques à la Fig. 18).

3.1.2.2. Relation entre la concentration en inhibiteur et la vitesse de montée de fluorescence, le niveau de ϕmax, l'aire complémentaire de fluorescence normalisée

En faisant varier la concentration en inhibiteur et en mesurant les cinétiques d'induction de fluorescence de Chl_a sur les chlorelles, il est possible d'obtenir des familles de courbes qui sont représentées sur les Figures 20 (DCMU, Barbane, Propanil, Atrazine et Ioxynil) et 21 (Lénacile, Pyramine, RU 15086, Metribuzin et RU 21731).

La première constatation qui est à faire en observant ces courbes est l'augmentation du niveau initial de fluorescence, particulièrement dans le cas des inhibiteurs les plus puissants (DCMU, Ioxynil, Lénacile, Metribuzin) et aux concentrations élevées uniquement. Bien que cette observation aurait dû être placée dans le § 3.1.1. de ce chapitre, l'effet comparatif de diverses concentrations en inhibiteur permet une meilleure mise en valeur du phénomène, sans qu'une relation quantitative avec la concentration soit toutefois possible, compte-tenu de l'imprécision de la mesure. Une telle augmentation de ϕ_0 avait été observée par JOLIOT (1965) sur algues en présence de DCMU, et par DELOSME (1967) sur chloroplastes avec de la DCMU ; ce dernier propose un modèle dans lequel l'augmentation de $\phi 0$ produite par DCMU serait le reflet d'une action préventive de l'inhibiteur sur un quencher non photochimique R. En utilisant des conditions expérimentales particulières, BENNOUN et LI (1973) suggèrent que l'augmentation du niveau induit par DCMU correspond à l'inactivation d'une partie des centres du PS II en une forme non-quencher. Nous reviendrons sur ce point.

En ce qui concerne les fluorescences maximales ϕmax, nous avons recherché une relation entre la concentration en inhibiteur et l'augmentation du niveau de ϕmax. En choisissant des valeurs de concentrations en inhibiteurs suffisamment rapprochées et entourant la pI_{50} mesurée tel que cela est décrit dans le chapitre II, il est possible de construire les droites reliant la concentration à la valeur de ϕmax, en utilisant un graphique à échelle log-probit (Fig. 22). A partir de ces droites, les concentrations produisant une stimulation de 50 % de ϕmax sont obtenues (ϕmax 50), leur p ϕmax_{50} calculé et les valeurs de p ϕmax_{50} comparées aux pI_{50} obtenues dans les mesures présentées dans le chapitre II (Tableau 9). De ces résultats, il apparaît que les valeurs d'inhibitions de la réaction de Hill et celle des stimulations de fluorescence sont du même ordre de grandeur, bien que pour certaines molécules, les $p\phi max$ soient nettement supérieures aux pI_{50} ; cette différence se retrouve dans les travaux de ZWEIG et al (1963), sans que les auteurs n'y aient toutefois attaché une importance particulière.

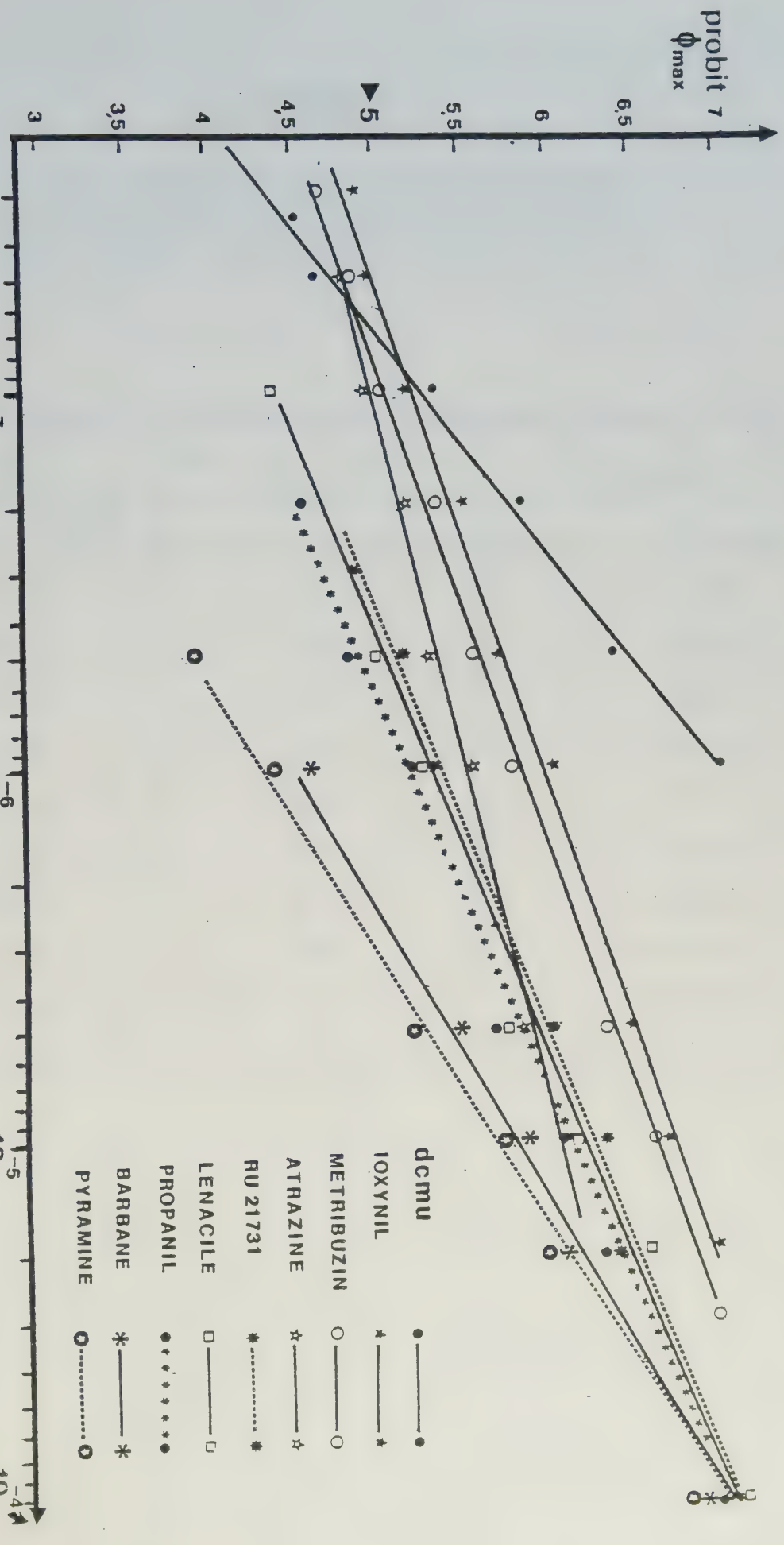


FIGURE 22 : Relation entre la concentration en inhibiteurs de photosynthèse et les valeurs de fluorescences maximales ϕ_{max} (échelle log-probit)

Tableau 9

Comparaison entre les cologarithmes des concentrations en inhibiteurs produisant 50 % de stimulation du fluorescence maximale (p ϕ max 50) et les pI_{50} obtenues sur la réaction de Hill (Ferricyanure, accepteur d'électrons)

PRODUIT	p ϕ max 50	pI_{50} Réaction de Hill basale
DCMU	7,22	6,82
Barbane	5,62	4,00
Propanil	6,22	5,29
Atrazine	6,92	5,76
Ioxynil	7,30	6,57
Lenacile	6,40	6,67
Pyramine	5,52	5,85
Metribuzin	7,09	6,57
RU 21 731	6,53	5,55

Tableau 10

t 1/2 de montée de fluorescence exprimées en m.sec, obtenues en présence de différentes concentrations en inhibiteurs

	10^{-7}M	10^{-6}M	10^{-5}M	10^{-4}M
DCMU	5,2	4,8	4,1	3,9
Barbane	-	-	5,3	4,1
Propanil	5,3	5,2	4,1	3,8
Atrazine	5,4	5,1	4,9	3,6
Ioxynil	4,8	4,7	4,5	3,5
Lenacile	5,1	5,3	4,0	3,8
Pyramine	-	4,8	4,6	3,7
Metribuzin	5,4	5,1	4,8	3,5
RU 21731	5,1	4,8	4,1	3,8
TEMOIN		4,2		

Rappelons que le rendement maximal de fluorescence est atteint lorsque Q est complètement réduit, par exemple en bloquant sa réoxydation par le PS I via PQ et B par des inhibiteurs de type-DCMU.

En fait, nous comparons des résultats d'essais réalisés dans des conditions expérimentales différentes : la mesure de la réaction de Hill, en présence de ferricyanure, est effectuée sur des chloroplastes isolés, sous une forte intensité lumineuse et en présence de concentration en chlorophylle de l'ordre de 120 γ/ml, tandis que les cinétiques de fluorescence sont mesurées sur des algues, dont la concentration est relativement faible sur la base de la teneur en chlorophylle, et qui reçoivent des intensités lumineuses beaucoup plus faibles. Malgré ces différences dans les conditions expérimentales, il est intéressant de noter que les mesures d'inhibition du transport d'électrons par les inhibiteurs correspondent relativement bien à la réduction de Q, mesurée par les ϕmax.

Nous avons vu que l'amplitude de la variation de fluorescence est considérablemen augmentée en présence d'inhibiteurs du type-DCMU, et que cette augmentation était proportionnelle à la concentration. L'observation visuelle des courbes d'inductio pendant la phase d'activation suggère que les vitesses apparentes de réaction pho tochimique sont fortement accélérées en présence d'inhibiteurs. Cette accélérati provient en fait de la suppression des réactions concurrentes vis-à-vis de la réduction de Q^-. Nous avions précédemment vérifié le caractère sigmoïdal des courbe d'induction, il est donc aisé de déterminer avec précision les temps de demi-mont de fluorescence, entre ϕ_0 (0 %) et ϕmax (100 %). Les valeurs de t 1/2 ainsi calculées sont présentées dans le tableau 10 : d'où l'on peut déduire que, comparativement au témoin, les temps de demi-réaction de ces cinétiques sont du même ordr de grandeur en présence des inhibiteurs, bien que légèrement plus faibles aux plu fortes concentrations qu'en leur absence. Cette observation avait déjà été faite par JOLIOT (1963) avec la CMU et l'O-phénanthroline.

La recherche d'une relation quantitative entre la concentration en inhibiteur de type-DCMU et un paramètre des cinétiques de fluorescence conduit à imaginer que, si les temps de demi-réactions des cinétiques d'induction de fluorescence restent constants, et que les ϕmax varient d'une façon proportionnelle à la concentration le produit entre la vitesse de réaction photochimique et le temps doit varier selon une certaine proportionnalité avec la concentration en inhibiteur. Ce produ est en fait représenté par l'aire complémentaire de fluorescence, comme l'ont mon MURATA et al (1966) qui suggèrent que cette aire A est proportionnelle au nombre quanta utilisé par le centre réactionnel PS II et est représentée par l'équation

$$A = \int_0^{\infty} \left(\Delta\Phi_{max} - \Delta\Phi_t \right) dt \qquad (7)$$

dans laquelle $\Delta \phi t$ correspond à la variation de fluorescence en fonction du temps t, et $\Delta \phi max$ les changements de fluorescence variable maximale.

En d'autres termes, A_{max} représente la taille du pool d'accepteurs d'électrons du PS II (FORBUSH et KOK, 1968), ou, selon ETIENNE et al (1974), la capacité de quenching photochimique lorsque A_{max} est normalisé à ϕmax .

Ces hypothèses ont été vérifiées expérimentalement par BENNOUN et LI (1973) et MELIS et HOMANN (1975) ; toutefois, aucune relation quantitative entre concentration en DCMU et A_{max} n'a été établie. Nous avons donc réalisé ces mesures pour les différents inhibiteurs de "type-DCMU", en espérant trouver une relation entre les concentrations et les A_{max}.

Dans un premier temps, nous avons mesuré A_{max} avec des concentrations de DCMU de 10^{-7} à 10^{-6}M, afin de rechercher un modèle d'analyse de la forme de la relation possible entre effet et dose, en entourant la valeur de la pI_{50}. Une vitesse de balayage rapide (5 msec/division) a été choisie afin d'obtenir une bonne précision sur la mesure de l'induction de fluorescence. La ϕ max a été estimée en laissant ouvert l'obturateur.

Les courbes d'induction obtenues entre 10^{-7}M et 10^{-6}M sont présentées sur la figure 23-a. Les aires complémentaires correspondantes, normalisées à ϕ max, sont mesurées en pesant les différentes images de A_{max} ; ces valeurs sont portées sur le graphique présenté sur la figure 23-b - L'allure apparemment sigmoïdale de la courbe obtenue suggère de réaliser une transformation log-probit ; cependant, l'absence de 100 % ne permet pas une telle analyse, utilisable uniquement lorsque l'on est en présence de fréquences. Par suite, nous nous sommes adressés aux fonctions "logistiques", en particulier aux transformations en "logit" et en "arc-sinus" telles que proposées par ASHTON (1972) :

. Le "logit" (contraction du terme *"logistic curve"*, BLISS (1934)), est une fonction comparable au "probit" donné par l'équation (5), paragraphe 3.2.1.2. et est fourni par la relation :

$$\text{logit } P = \ln \frac{P}{1-P} = \alpha + \beta x \qquad (8)$$

. La fonction "arc sinus" correspond à une transformation angulaire donnée par la relation (FISCHER et YATES, 1963) :

$$k = \sin^{-1} (2P-1) = \alpha + \beta x \qquad (9)$$

de la fonction "sinus" recommandée par KNUDSEN et CURTIS (1947) de la forme :

$$P = \frac{1}{2} [1 + \sin (\alpha + \beta x)] \quad \text{si} \quad -\pi/2 < \alpha + \beta x \leqq \pi/2$$

lorsque l'on est en présence d'une échelle limitée de valeurs observées, ce qui est le cas ici.

En pratique, il est nécessaire de comparer les valeurs de A_{max} à $1-A_{max}$ (représentant l'aire inférieure à l'induction de fluorescence dans l'intervalle ϕ_0 - ϕmax). Le calcul de ces fonctions, à partir des valeurs observées, permet la représentation en droites "logit" et "arc-sinus", présentées sur la figure 23 c, qui montrent une cassure très nette correspondant à une concentration de 5.10^{-7}M en DCMU : au delà de cette cassure, l'évolution des A_{max} en fonction de la concentration en inhibiteur n'obéit plus à une loi log-normale : le calcul de l'équation correspondant à cette 2ème droite montre que nous sommes en présence d'une forme exponentielle dont la pente, après transformation en droite, est très faible.

Cependant, l'analyse de régression linéaire de la droite comprise entre 10^{-7} et 5.10^{-7}M montre que celle-ci est parfaitement sigmoïdale (coefficients de corrélation 0,995 et 0,998 pour les transformations "logit" et "arc-sinus", respectivement) droites à partir desquelles il est possible de mesurer un demi-effet. Si l'on appelle $pSA_{max_{50}}$ le co-logarithme de la concentration produisant 50 % d'augmentation d'A_{max}, il est apparu intéressant de comparer ces valeurs aux pI_{50} obtenues sur la réaction de Hill pour les différents inhibiteurs de "type-DCMU". Les valeurs comparées sont présentées dans le tableau 11 d'où il ressort qu'une très bonne corrélation existe entre les pI_{50} mesurées sur chloroplastes et les $pSA_{max}50$. Puisque nous sommes en présence de 2 droites distinctes (phénomène non comparable à la biphasicité observée par MELIS et HOMAN (1975), dans le sens où les auteurs présentaient des cinétiques d'accumulation de A en fonction du temps et non des variations A_{max} en relation avec un traitement quelconque), on peut se poser la question d'un choix entre ces deux droites comme représentations du degré de réduction du pool d'accepteur d'électrons du PS II. Compte-tenu de l'excellente concordanc entre les valeurs de demi-effet sur la croissance des A_{max} et celles obtenues par la mesure des inhibitions du transport d'électrons, il est tentant de suggérer que l'effet produit par les inhibiteurs sur l'évolution des A_{max} est bien représentatif d'une rupture de liaison entre Q et le système de transporteurs situé entre Q et PS I .
Cette observation suggère qu'à la valeur de concentration en inhibiteur de "type-DCMU" correspondant à 50 % de stimulation de la taille de A_{max} (ou $pSA_{max_{50}}$) et à la pI_{50} par extension, environ 50 % du PS II se trouvent isolés du PS I, ce qui devrait avoir pour conséquence que la moitié des centres PS II sont bloqués.

Au-dessus d'une certaine concentration en inhibiteur correspondant à la cassure de pente observée sur la Figure 23-c, l'aire complémentaire totale ne varie pratiquement plus. Si la mesure de l'aire complémentaire représente bien une mesure quantique relative du substrat de la réaction photochimique q_0 - selon MURATA et al (1966) et MALKIN et KOK (1966) - (en d'autres termes, le nombre de quanta utilisé par le centre réactionnel PS II), la relation entre A_{max} et q_0 suit la loi de conservation d'énergie de formule (ETIENNE et al, 1974)

$$\frac{dq^-}{dt} = \alpha I (1 - \beta \Phi) \qquad (9)$$

dans laquelle α est la fraction active de l'absorption lumineuse et β le rapport de la somme des rendements de l'ensemble des désactivations sur le rendement de fluorescence. Les auteurs montrent une invariance des aires complémentaires lors que les centres sont bloqués (mais non détruits) lorsque α varie de la même façon que q_0 et que β est constant. Lorsque β varie la règle d'invariance n'est plus valable. Nous pouvons rapprocher cette hypothèse de nos résultats : aux concentrations relativement faibles en inhibiteur α et β varient, c'est-à-dire que la relation entre A_{max} et la concentration en substrat de la réaction photochimique q_0 suit une loi selon laquelle le blocage des centres n'est pas suffisant pour que le rapport des rendements de désactivation sur le rendement de fluorescence soit constant. Au-dessus d'une concentration-seuil, ce rapport β variant peu, l'aire de complémentarité reste pratiquement constante, c'est-à-dire que le rendement quantique du centre réactionnel PS II varie dans le même sens que la fraction active de l'absorption lumineuse α, ce qui ne peut être que le reflet du blocage des réactions inverses conduisant à la réoxydation de Q.

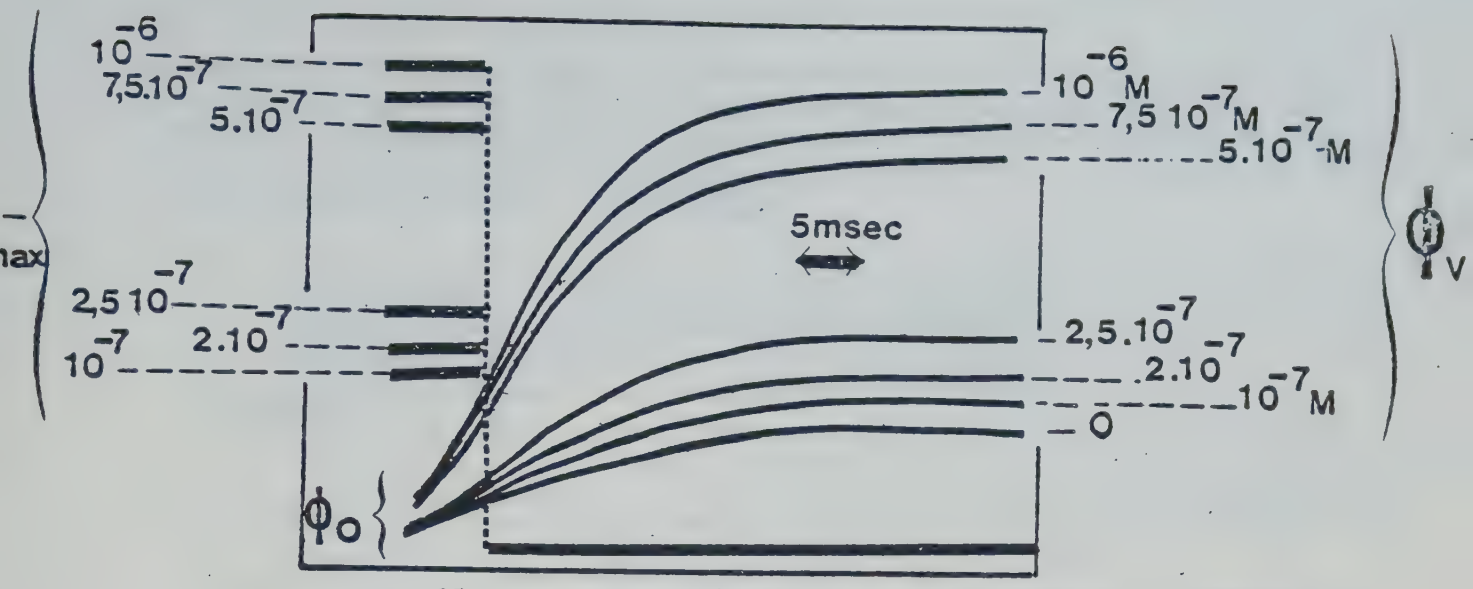


FIGURE 23 a : Cinétique d'induction de fluorescence en présence de différentes concentrations en DCMU, mesure sur chlorelles adaptées à l'obscurité *(flux photonique d'excitation moyen : 8,5 µEinstein / m² / sec⁻¹)*

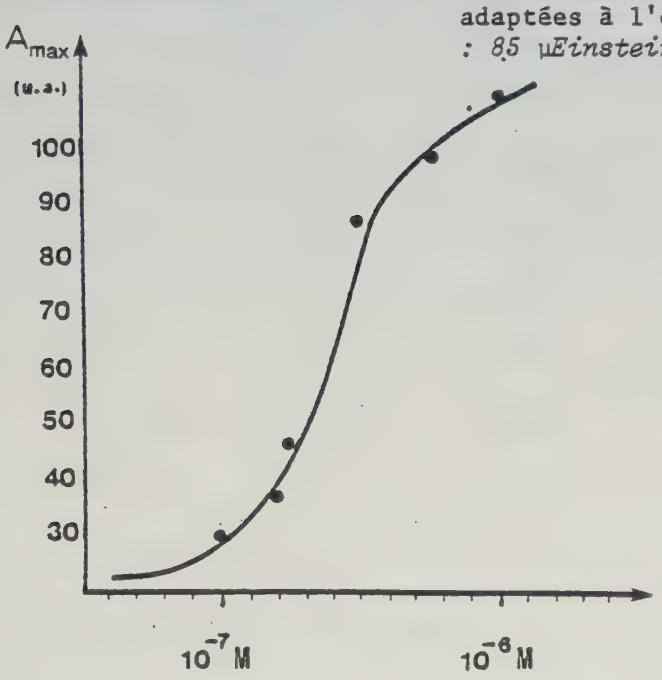


FIGURE 23 b : Relation entre l'augmentation des aires complémentaires A_{max} et la concentration en DCMU, obtenue à partir des aires de complémentarité mesurées sur la figure 23-a.

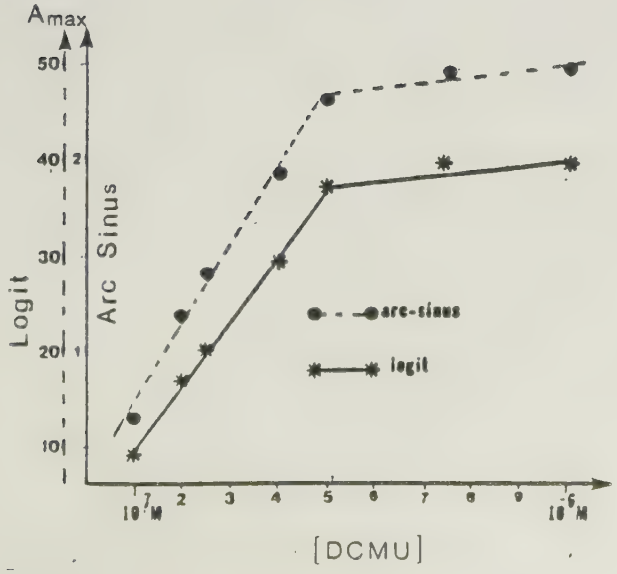


FIGURE 23 c : Transformation de la courbe représentée sur la Fig.24-b en droites par l'utilisation des fonctions *"arc-sinus"* et *logit*

TABLEAU 11

Comparaison entre les cologarithmes des concentrations de demi-effet obtenues sur la réaction de Hill (pI_{50}) et l'augmentation des aires complémentaires normalisées sur chlorelles ($p\ SA_{max_{50}}$)

Produits	pI_{50} Ferricyanure	$p\text{-}SA_{max_{50}}$
DCMU	6,82	6,8
Barbane	4,00	4,00
Propanil	5,29	5,31
Atrazine	5,76	5,68
Ioxynil	6,57	6,01
Lénacile	6,67	6,58
Pyramine	5,85	5,82
Metribuzin	6,57	6,49
RU 21731	5,55	5,45

Toutefois, si l'hypothèse d'une bonne relation entre les variations des valeurs de A_{max} et l'état de réduction du pool d'accepteur du PS II est correcte, la mesure des aires complémentaires constitue une méthode fine et surtout spécifique de l'inhibition des photoréactions au niveau du PS II. Ceci implique cependant que :

a. - le rapport Q^-/R^- reste constant, pour une concentration en inhibiteurs déterminée sachant que DCMU (et probablement les inhibiteurs du même type) agit en réalité sur le potentiel de R (ou B) et pour un temps donné.

b. - les photocentres soient presque totalement saturés en inhibiteurs, à une concentration définie, ce qui n'est peut être que le reflet d'une accessibilité de plus en plus difficile au site d'action, suggérant la présence d'une répartition topographique des molécules-cibles (B) au-travers de la membrane du thylacoïde.

c. - Alternativement à l'hypothèse b. proposée ci-dessus, le rendement quantique du centre PS II varie dans le même sens que la fraction active de l'absorption lumineuse, puisque les réactions de réoxydation de Q sont bloquées au-dessus de la concentration-seuil.

d. - la mesure d'une inhibition de la réaction de Hill avec H_2O donneur d'électrons et un accepteur (Ferricyanure, $NADP^+$) n'est représentative de l'inhibition de la réoxydation de Q^- par PQ que lorsque l'on a vérifié l'identité du site d'action (comparer le "type-DCMU" à la trifluraline ou le nitrofène entre les mesures de réaction de Hill et de fluorescence).

3.2. - Chloroplastes

3.2.1. - Comparaison qualitative des divers inhibiteurs sur l'induction de fluorescence

Sur une préparation Témoin (30 γ chlorophylle/ml) nous vérifions en premier lieu la qualité des chloroplastes obtenus en ce qui concerne l'interconnexion entre les 2 photosystèmes par l'observation d'un certain effet "KAUTSKY", c'est-à-dire la présence des phases OI et IP selon la terminologie de LAVOREL (1959). La fluorescence stationnaire S, en l'absence d'inhibiteur est superposable au niveau de fluorescence P et est atteinte en moins de 800 msec (Fig. 24).

Les inhibiteurs sont appliqués en un premier temps à une concentration variant de 10^{-4} à 10^{-6} M selon le produit, de sorte que la concentration finale en éthanol soit inférieure à 1 %. Les reproductions d'images photographiques obtenues à partir des enregistrements des cinétiques de fluorescence en présence d'un représentant de chaque famille d'inhibiteurs sont présentés sur les figures 25 et 26 . Un certain nombre d'observations peuvent être faites à partir des mesures :

- comme chez *Chlorella*, on distingue 2 groupes d'inhibiteurs : ceux présentant une cinétique d'induction de fluorescence identique à la DCMU : il s'agit des *N-phénylcarbamates, N-acylanilides, hydroxybenzonitriles halogénés, pyridazinones, s-triazines, triazinones, uraciles et 1,2,4, thiadiazoles*.
  A l'inverse, un 2ème groupe de familles chimiques ne change pas de façon notable ces cinétiques : les *diphényléthers* et les *dinitroanilines* et seraient, comme cela a été vu sur chlorelles, à exclure des inhibiteurs de "type-DCMU".

- la fluorescence stationnaire ϕ max n'est pas stimulée par l'addition des inhibiteurs de type DCMU, mais est identique au témoin, soit (cas le plus général) d'un niveau inférieur selon des facteurs qui semblent provenir de la qualité de la préparation chloroplastique et qui ne sont pas contrôlables.
  Nous reviendrons sur ce point.

- En utilisant une vitesse de balayage suffisamment rapide (5 msec/division), le caractère sigmoïdal de la montée de fluorescence pendant la période d'activation est vérifié selon la méthode décrite dans le paragraphe 3.1.2.1, c'est-à-dire la transformation "log-probit", et en prenant soin d'utiliser une concentration en inhibiteur suffisamment forte pour supprimer toute "trace" de composante de la phase thermique et obtenir une ϕ max représentative du 100 %. Les coefficients de corrélation obtenus sont identiques à ceux présentés dans le tableau 8.

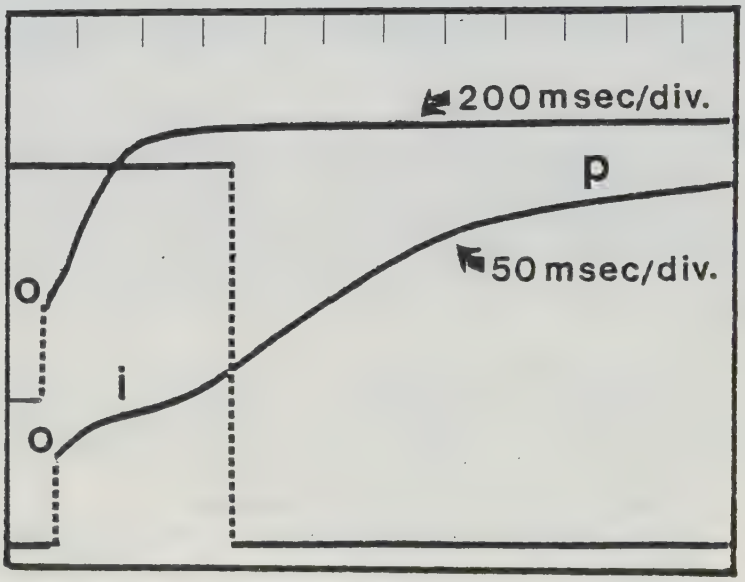
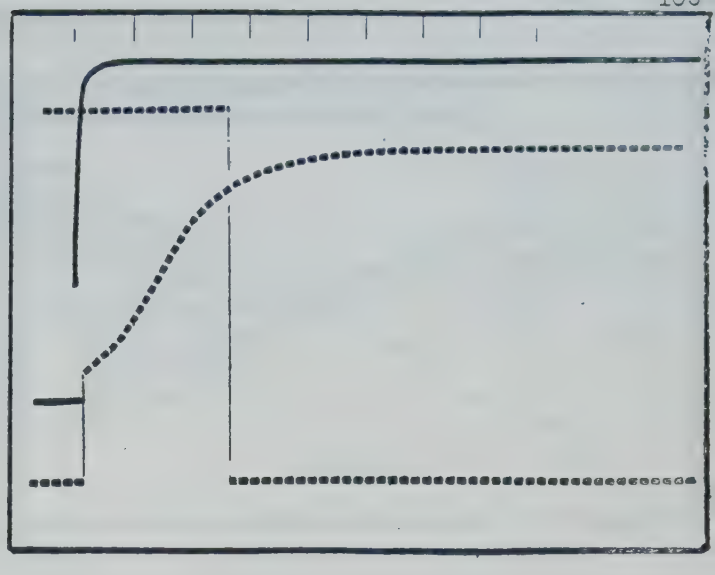
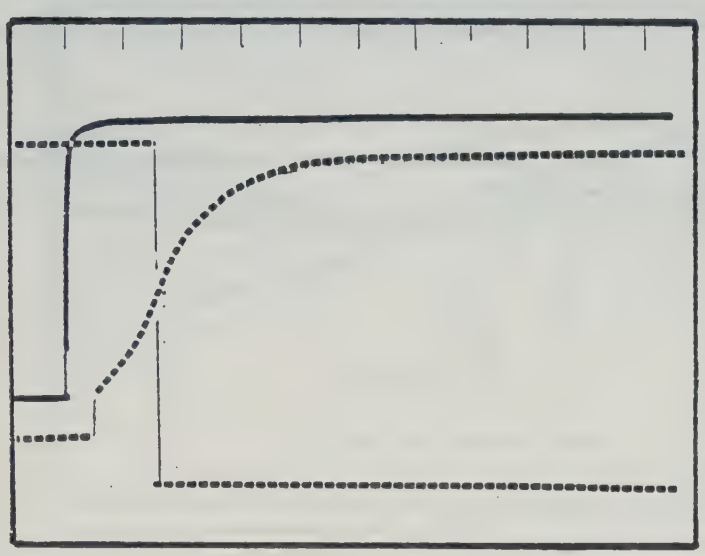


FIGURE 24 : Courbes d'induction de fluorescence de chloroplastes non traités de tabac (*30γ chlorophylle /ml ; intensité de la lumière d'excitation équivalente à un flux photonique : 85 µEinstein/m2/sec).*

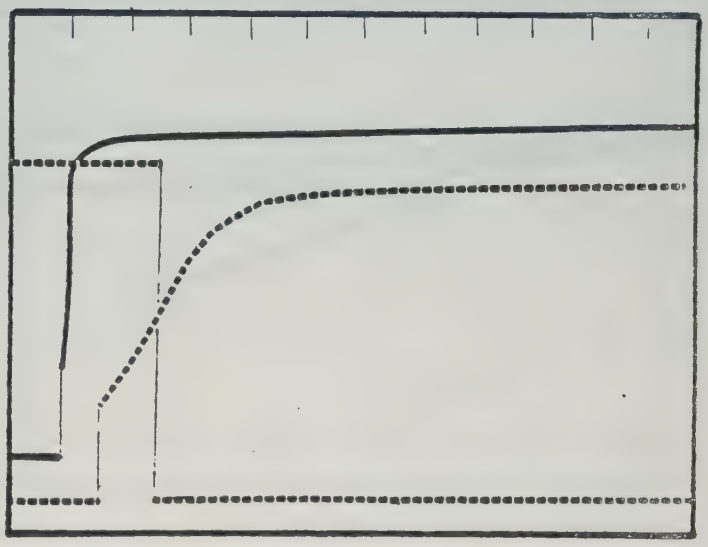
DCMU 10^{-7} M + TEMOIN 50 msec/div.



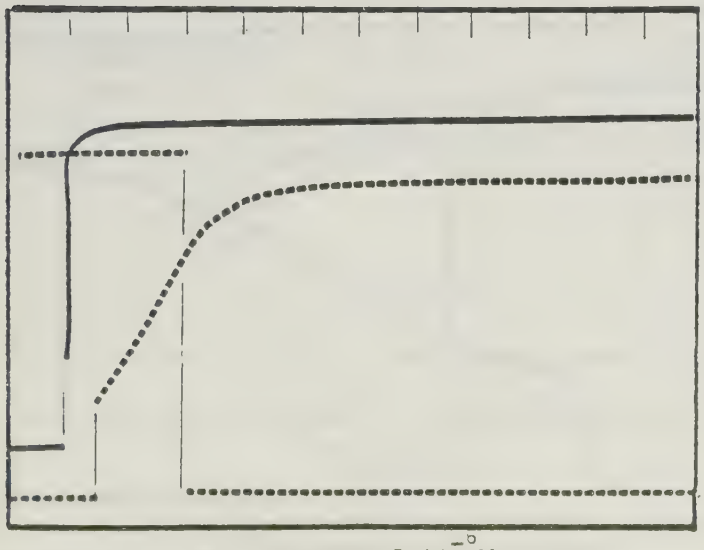
DCMU 10^{-6} M



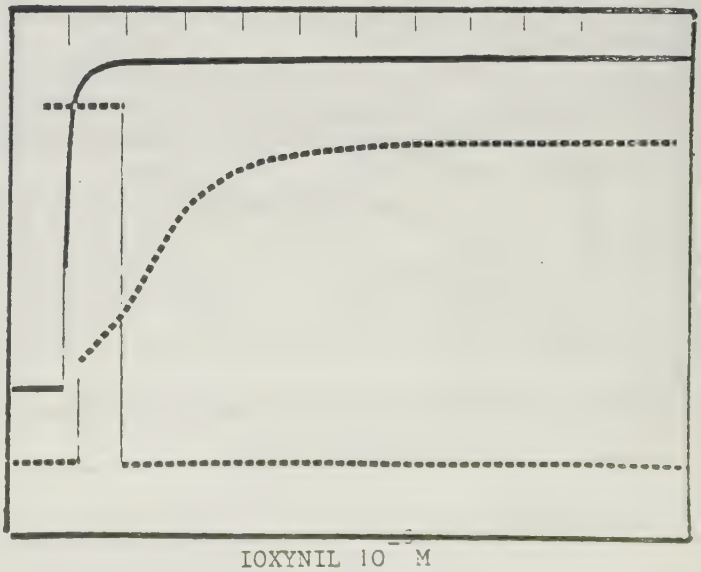
BARBANE 10^{-4} M



PROPANIL 10^{-5} M

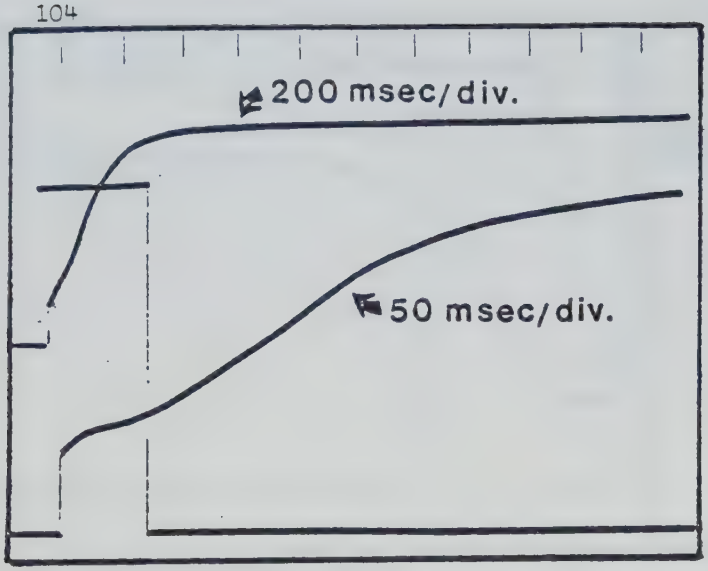


ATRAZINE 5.10^{-6} M

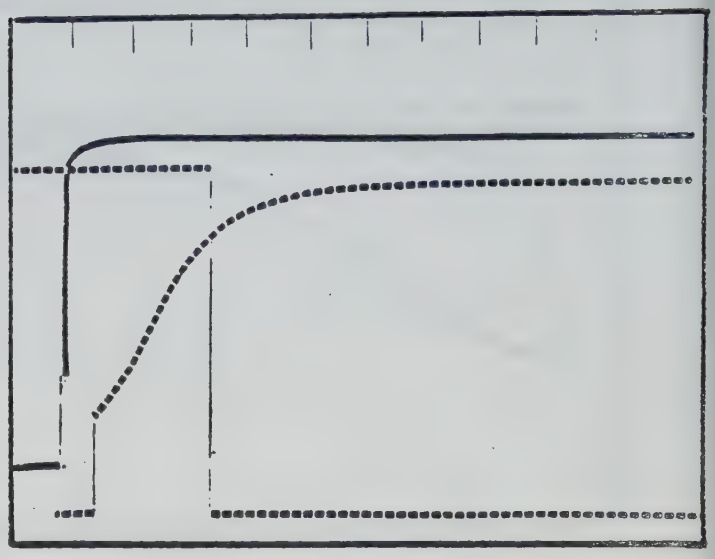


IOXYNIL 10^{-5} M

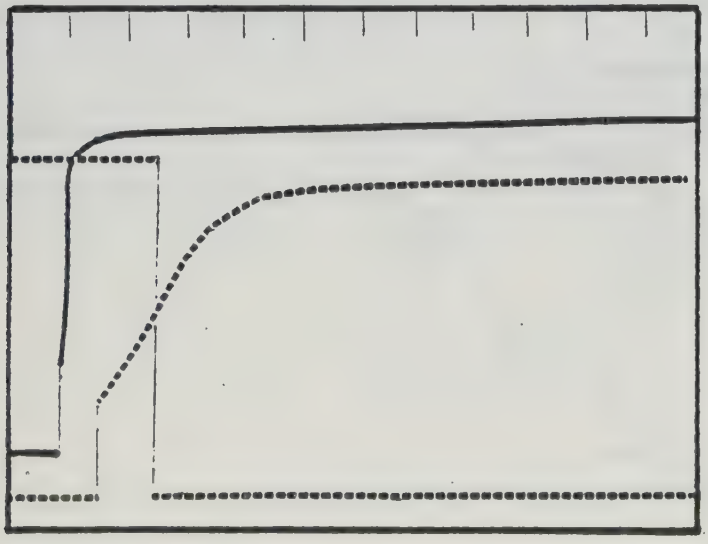
FIGURE 25 : Courbes d'induction de fluorescence obtenues avec les chloroplastes de tabac *(conditions expérimentales identiques à celles de la* Fig. 24 ; *trace supérieure : 200 msec/div., trace inférieure : 10 msec/div. sauf indication particulière).*



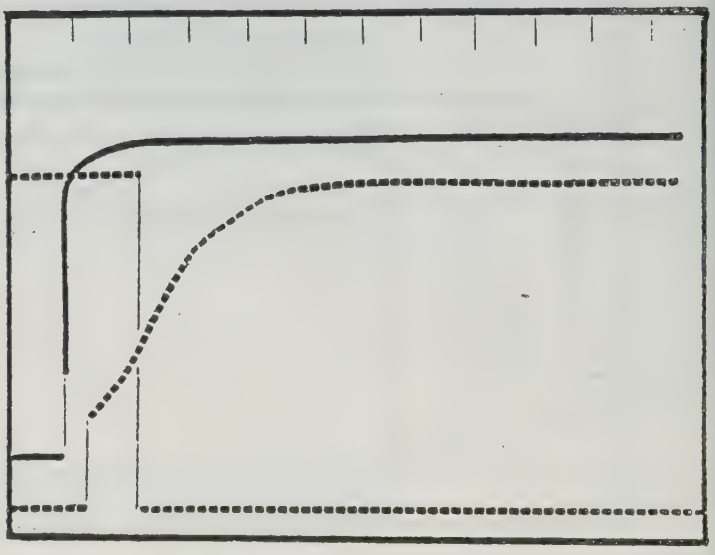
TEMOIN 50 et 200 msec.



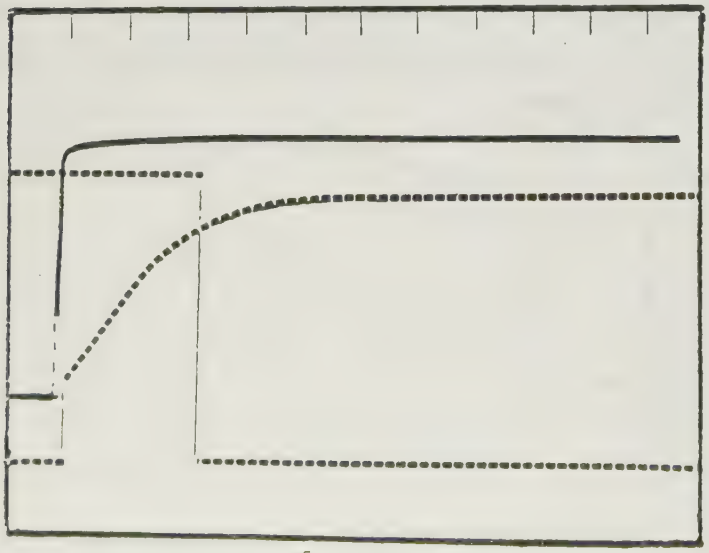
LENACILE 10^{-5}M (10 et 200 msec/div.)



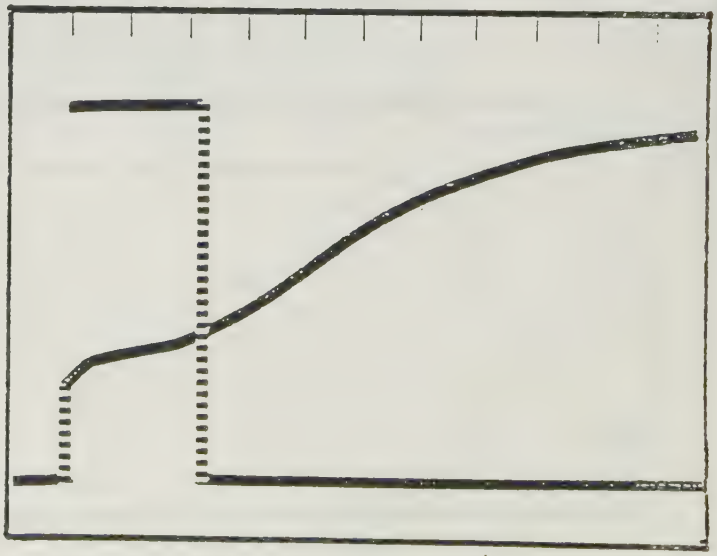
PYRAMINE 10^{-5}M (10 et 200 msec/div.)



METRIBUZIN 10^{-6}M (10 et 200 msec/div.)

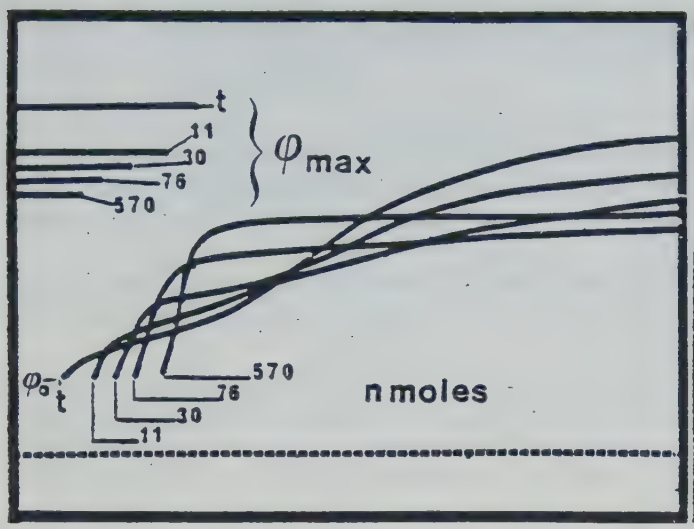


RU 21.731 10^{-5}M (100 et 200 msec/div.)

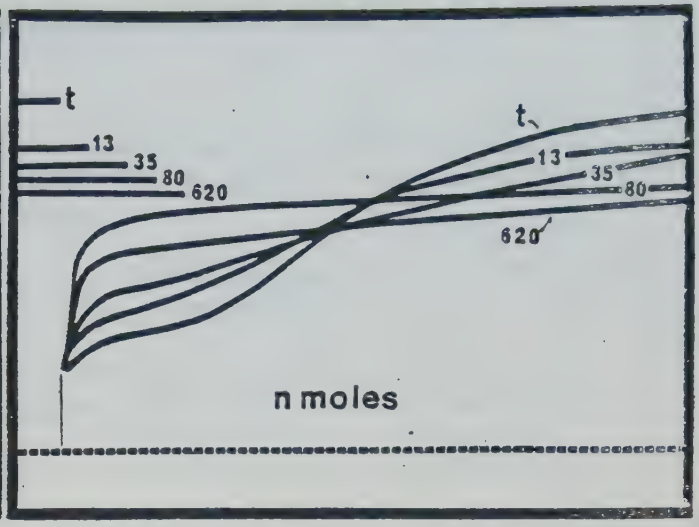


TRIFLURALINE et NITROFENE 10^{-4}M (50 msec/div.)

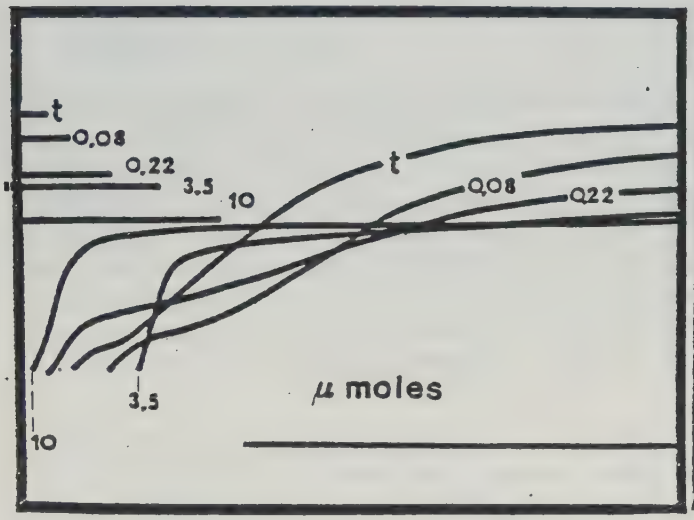
FIGURE 26 - Courbes d'induction de fluorescence obtenues avec les chloroplastes de tabac *(conditions expérimentales identiques à la Fig. 24 ; trace supérieure : 200 msec/div., trace inférieure : 10 msec/div. sauf indication particulière).*



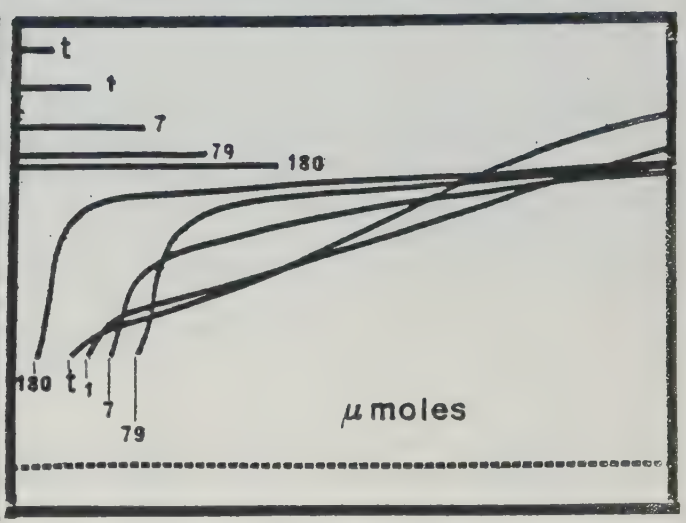
D.C.M.U.



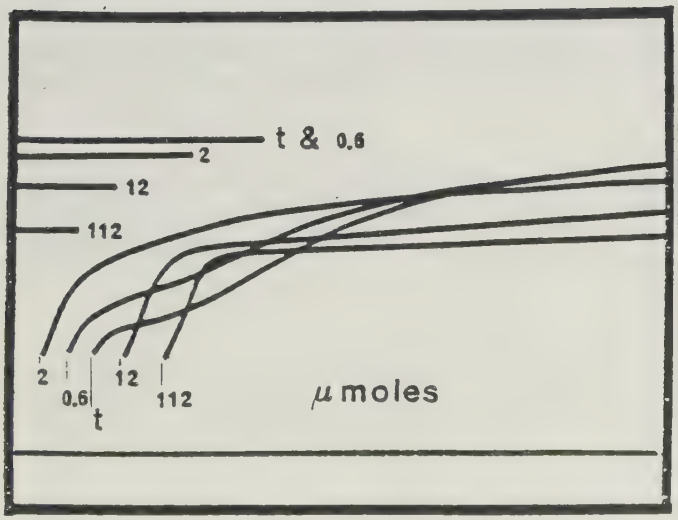
LENACILE



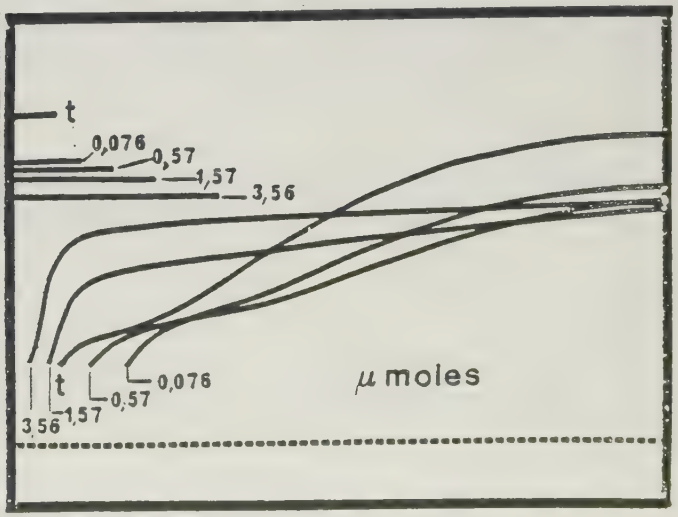
ATRAZINE



BARBANE



PYRAMINE



IOXYNIL

FIGURE 27 - Courbes d'induction de fluorescence obtenues avec des chloroplastes de tabac en présence de différentes concentrations de quelques inhibiteurs de "type-DCMU" *(conditions expérimentales identiques aux* Fig. 25 et 26 ; *50 msec/division, t = témoin ; les concentrations sont indiquées dans les figures)*

3.2.2. - Recherche d'une relation quantitative entre la concentration en inhibiteur de "type-DCMU" et un paramètre lié à l'induction de fluorescence

La mauvaise reproductibilité des résultats obtenus, dans des essais préalables, avec des chloroplastes pelés, préparés selon la méthode décrite dans le Chapitre II, nous a conduit à rechercher une autre technique.

Nous nous sommes adressés à l'extraction de chloroplastes intacts, à partir de tabac et décrite dans le Chapitre II - première partie - paragraphe 1.2.3.

Certaines courbes d'induction de fluorescence obtenues avec les suspensions de chloroplastes de tabac, en présence de quelques représentants de "type-DCMU", à différentes concentrations en inhibiteurs, sont présentées sur la figure 27.
A partir des courbes obtenues, il est possible de formuler quelques observations :

. Le niveau de fluorescence initiale $\phi 0$ n'est pas augmenté de façon significative par rapport au témoin, comme cela était le cas avec les chlorelles pour certains inhibiteurs, et, dans des essais préliminaires, sur chloroplastes de pois (non représenté ici).

L'augmentation du niveau de $\phi 0$ observée par BENNOUN et LI (1973) avec des chloroplastes d'épinard, en présence de fortes concentrations en DCMU, avait été interprétée en termes d'une inactivation d'une partie des centres PS II en une forme non quencher, ou par la prévention de l'action d'un quencher non photochimique par DCMU (DELOSME, 1967). Une augmentation importante de $\phi 0$ peut être évidemment obtenue par une pré-illumination (DELOSME, 1967), observation largement utilisée par la suite dans l'étude des propriétés du côté donneur du PS II.
Dans cet esprit, l'hypothèse d'un effet possible de DCMU sur le côté donneur du PS II avait été avancée (RENGER, 1973 - ETIENNE, 1974).

. En présence des inhibiteurs, la fluorescence maximale est toujours inférieure à celle du témoin, même faiblement, mais en aucun cas supérieure. Sur ce point, il n'est donc pas possible d'appliquer le même raisonnement que celui utilisé avec les chlorelles, le niveau de ϕmax ne représentant pas, dans le chloroplaste, une mesure de l'état rédox de l'accepteur d'électrons Q. Cette observation peut être interprétée par la mise en évidence d'un effet quencher du pool de PQ lorsque Q est complètement réduit, avec des chloroplastes adaptés à l'obscurité et en présence de DCMU (VERNOTTE et al, 1979).

. Les cinétiques de fluorescence variable sont considérablement accélérées, c'est-à-dire que la fluorescence maximale est atteinte plus rapidement que dans les chloroplastes-témoin.

Le problème consiste donc à essayer de trouver une relation quantitative entre ces mesures de fluorescence et la concentration en inhibiteurs, à partir des observations qui viennent d'être faites.

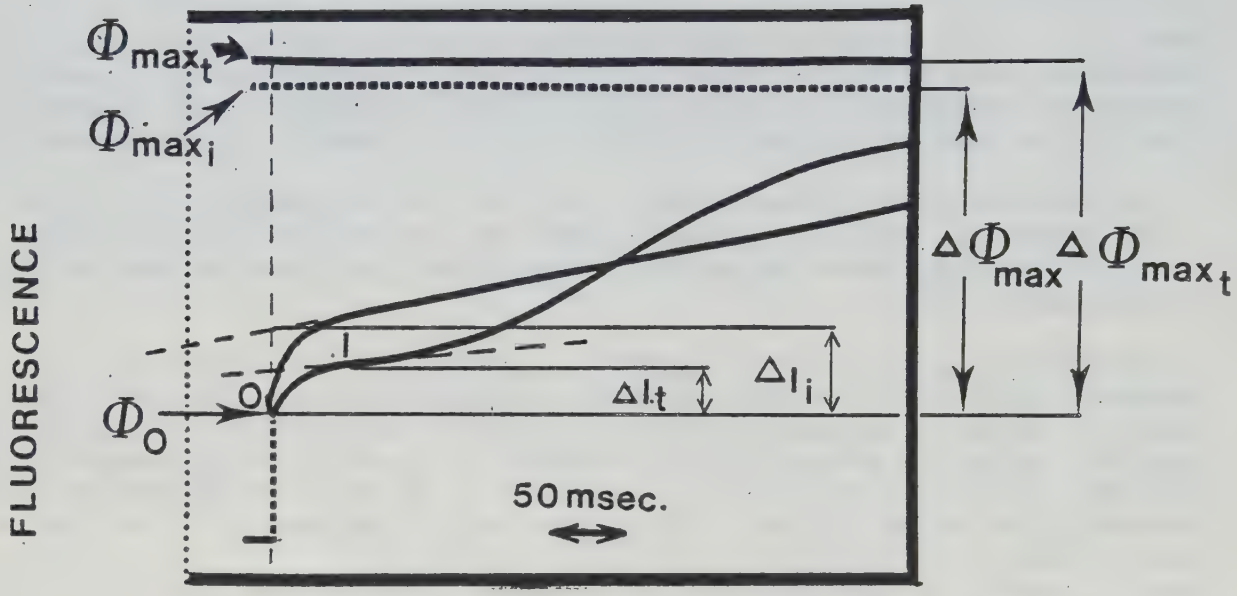


FIGURE 28 : MESURE DES VALEURS DE FLUORESCENCE TRANSITOIRE SUR CHLOROPLASTES DE TABAC (30 γ Chlorophylle/ml, énergie d'excitation équivalente à un flux photonique de 85 µEinstein/m^{-2}/sec^{-1}

ϕ_o	fluorescence initiale
ΔI_t et ΔI_i	variations du plateau de fluorescence transitoire sur chloroplastes témoin et traités, respectivement
$\phi\ max_t$ et ϕmax_i ...	fluorescence maximale en l'absence et en présence d'inhibiteurs, respectivement
$\Delta\ \phi max_t$ et $\Delta\ \phi max_i$	variations de fluorescence maximale en l'absence et en présence d'inhibiteurs, respectivement

3.2.2.1 - Relation entre la concentration en inhibiteur et les valeurs transitoires de fluorescence

En l'absence d'inhibiteur, une montée de fluorescence est observée jusqu'à un niveau transitoire I. Lorsque l'on ajoute des concentrations croissantes en inhibiteurs de "type-DCMU", la cinétique de la phase OI est accélérée et le niveau transitoire I est de plus en plus élevé. Si l'on appelle $\Delta \phi_I$ la différence entre le niveau ϕ_o et ϕI (Figure 28) et $\Delta \phi max$ les variations de fluorescence maximales définies par $\phi max - \phi_o$, nous pouvons mesurer les valeurs $\Delta \phi max - \Delta \phi_I / \Delta \phi max$ obtenues à partir de courbes d'induction de fluorescence en l'absence (Témoin) et en la présence d'inhibiteurs (ARNTZEN, 1979). Ces valeurs sont comparées au Témoin et données en pourcentages comparés au témoin des valeurs $\Delta \phi max - \Delta \phi_I / \Delta \phi max$ sont présentées sur les Figures 29 et 30.

Les $p\phi_{V_{50}}$, correspondant au co-logarithme des concentrations de demi-effet mesurées sur les courbes des Figures 30 et 31, sont présentées dans le Tableau 12. Le matériel chloroplastique étant différent de celui utilisé dans le Chapitre I de ce travail, nous avons mesuré les inhibitions de dégagement d'O_2 à l'électrode de type CLARK obtenues avec les mêmes chloroplastes de tabac, en présence ou l'absence des inhibiteurs, le ferricyanure étant accepteur d'électrons. Les valeurs de pI_{50} obtenues, ainsi que celles provenant des résultats présentés dans le Chapitre I, sont comparées avec les $p\phi_{V_{50}}$ dans le Tableau 12. De ces résultats, il apparait que pour un même matériel (chloroplastes de tabac), les valeurs de demi-effet obtenues sur la *stimulation du niveau de fluorescence transitoire I* par les inhibiteurs et les concentrations de demi-effet du *dégagement d'O_2* sont du même *ordre de grandeur*, pour tous les inhibiteurs, sauf pour *l'Ioxynil*. Ces éléments militent une fois de plus en faveur d'un site d'action commun à tous les inhibiteurs.

L'anomalie observée avec *l'Ioxynil* avait été précédemment notée sur des algues (voir tableau 11, & 3.1.2.2.) ; nous reviendrons sur ce point. Par ailleurs, la technique consistant à mesurer l'augmentation du niveau transitoire de fluorescence I constitue un moyen commode de tester si le pool d'accepteurs d'électrons A maintient Q sous sa forme oxydée et, par conséquent, dans quelle mesure les inhibiteurs de type-DCMU "déconnectent" Q de A. La bonne relation existant entre les inhibitions du dégagement d'O_2 et l'augmentation du niveau de fluorescence I indique que ces 2 processus sont liés. Il faut noter que, en observant l'allure de ces courbes d'induction de fluorescence, leur cinétique se simplifie progressivement (et ceci dès les concentrations les plus faibles en inhibiteur), ce qui correspond à la disparition de la phase thermique évoquée précédemment.

Les valeurs de pI_{50} obtenues sur le dégagement de l'O_2 et celles de $p\phi_{V_{50}}$ mesurées sur les chloroplastes de tabac, ne correspondent pas pour tous les inhibiteurs, aux pI_{50} représentant les concentrations de demi-effet sur la réaction de HILL (H_2O → Ferricyanure) mesurées sur chloroplastes de pois : c'est le cas de l'Atrazine, du Propanil et de RU 21731. Il semble, qu'à cet égard, les chloroplastes de tabac présentent une sensibilité supérieure aux inhibiteurs cités que ceux extraits de pois : cette observation est difficilement interprétable puisque la toxicité des herbicides inhibiteurs de photosynthèse vis-à-vis de la réaction de HILL est peu dépendante du matériel végétal utilisé (MORELAND et HILL, 1962). Cependant, les activités spécifiques des 2 types de chloroplastes étant très différentes, il est possible que le comportement de certains inhibiteurs varie en fonction de l'activité photoréductrice du matériel photosynthétique

FIGURE 29 : Evolution des valeurs transitoires de fluorescence en fonction de la concentration en DCMU, Lénacile, Ioxynil et Pyramine, exprimée en % du témoin et normalisée en ϕmax.

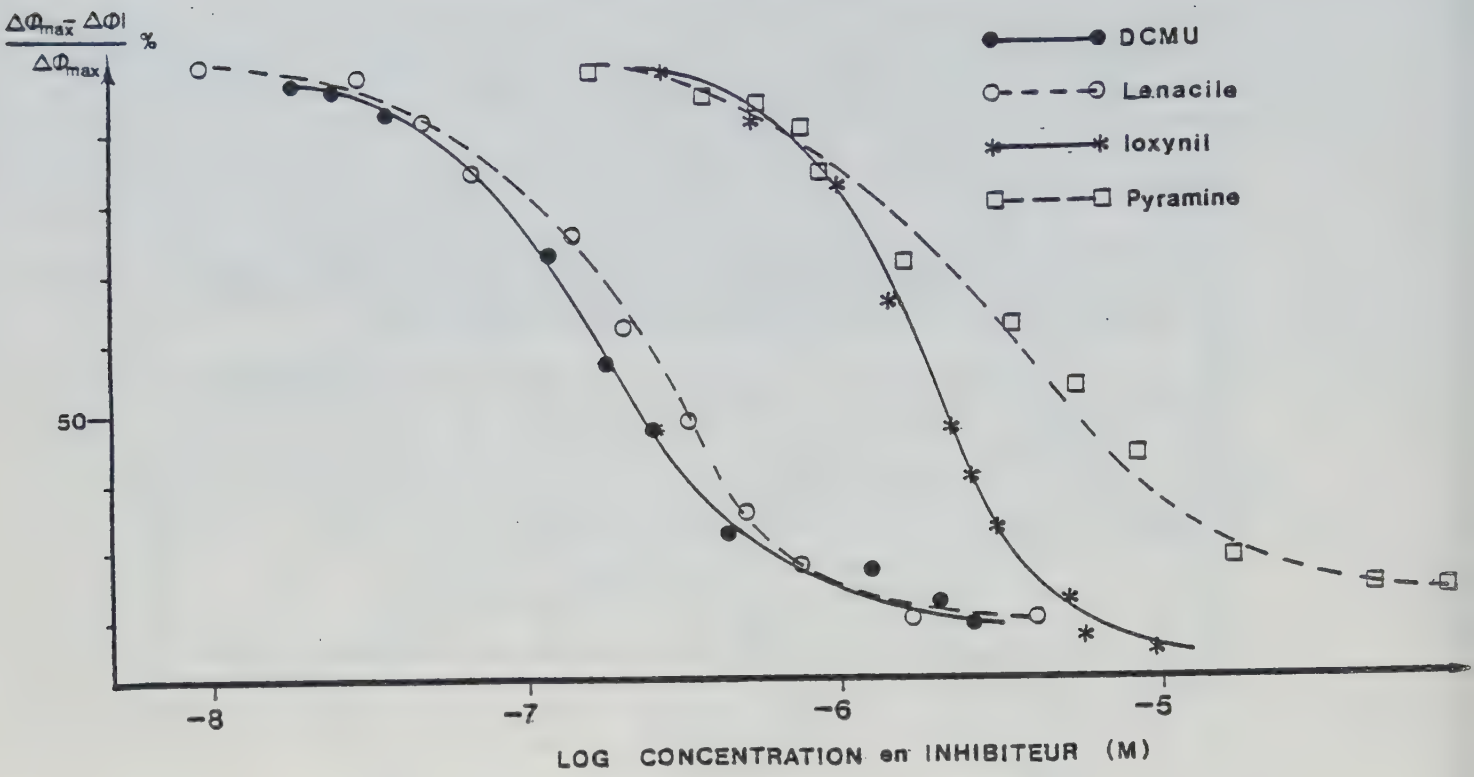


FIGURE 30 : Evolution des valeurs de fluorescence transitoires en fonction de la concentration en barbane, atrazine, RU 21731 et propanil

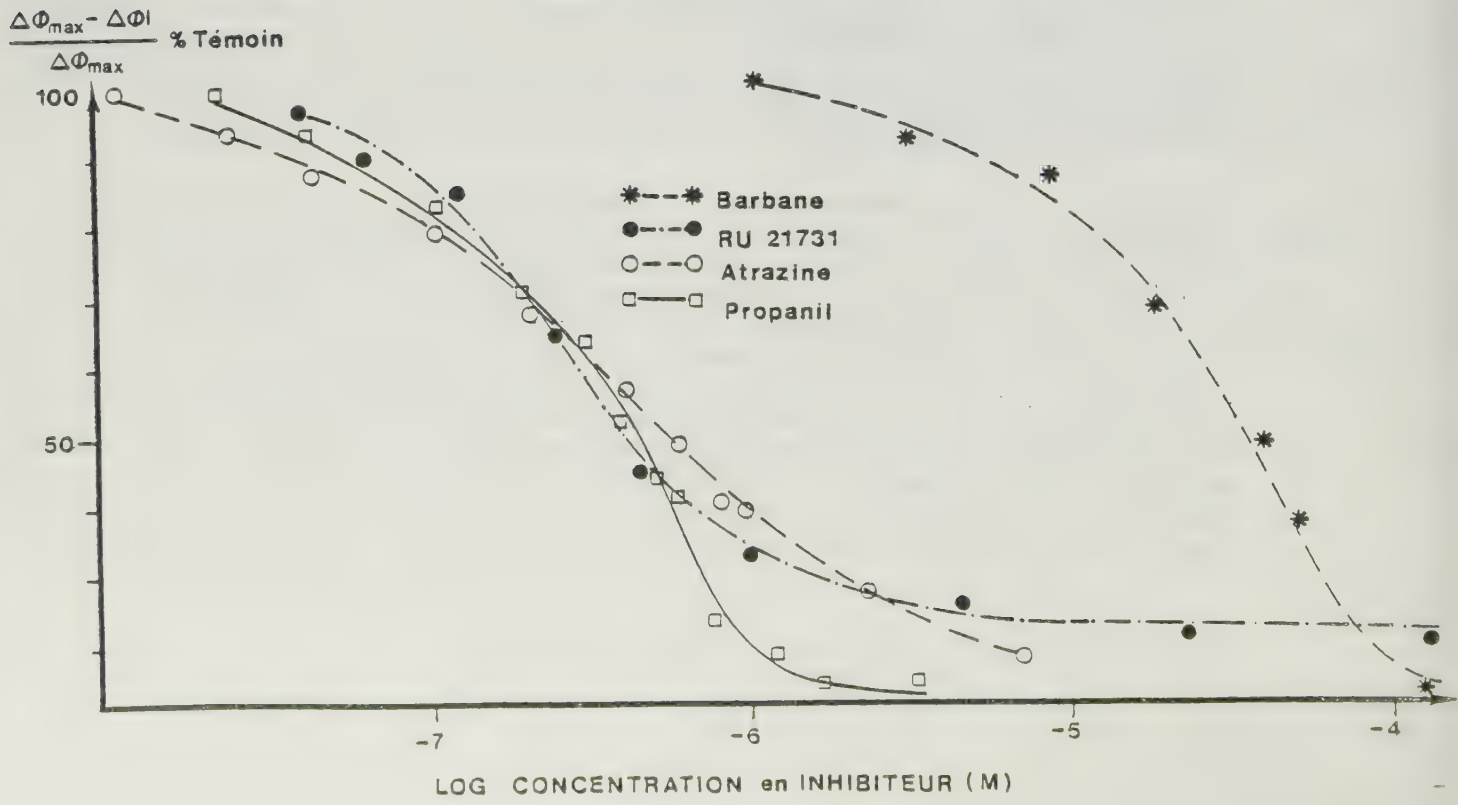


Tableau 12

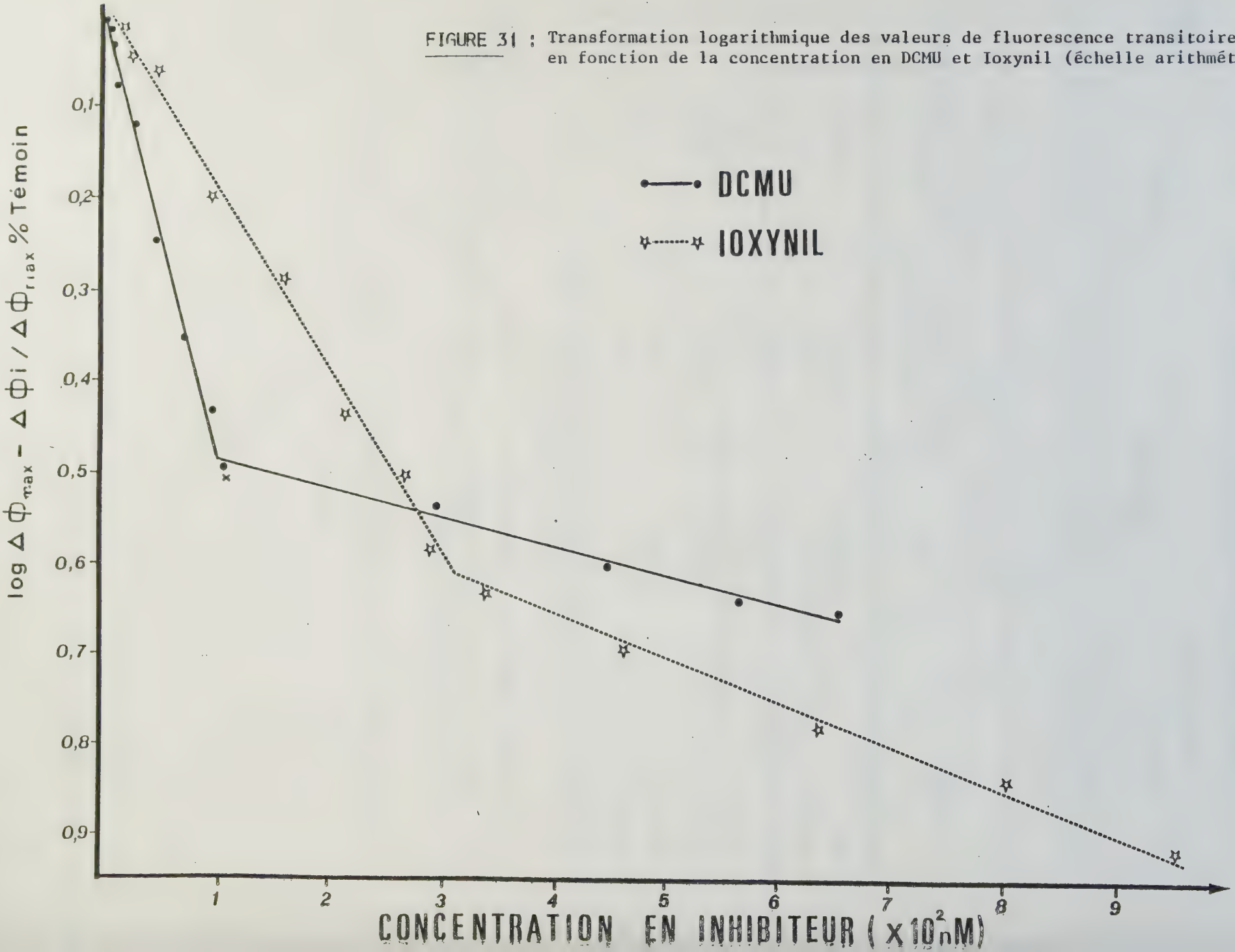
Comparaison entre les $p\,\phi_{v50}$ (cologarithmes des concentrations de demi effet mesurées à partir des courbes présentées dans les figures 30 et 31) les pI_{50} obtenues sur le dégagement d'O_2 (chloroplastes de tabac) et la réduction du ferricyanure (chloroplastes de pois)

PRODUITS	Chloroplastes de tabac		chloroplastes de pois
	$p\,\phi_{v50}$	pI_{50} dégagement (1) d'O_2 en présence de ferricyanure	pI_{50} réduction du ferricyanure (2)
DCMU	6,62	6,78	— 6,82
Lenacile	6,46	6,23	6,67
Atrazine	6,38	6,49	5,76
Propanil	6,31	6,15	5,29
Ioxynil	5,65	6,20	6,57
RU 21731	6,26	6,30	5,55
Pyramine	5,30	5,43	5,85
Barbane	4,48	4,05	4,00

(1) milieu réactionnel : tampon tris-HCl 20 µmoles , pH : 7,4 , NaCl 10 µmoles, ferricyanure de K 20 µmoles, chloroplastes équivalent à 50 γ chlorophylle/ml. Activité spécifique : 232 µmoles d'O_2 dégagé / mg chlorophylle / heure.

(2) pI_{50} présentées dans le paragraphe 1.4.2, chapitre II, 1ère partie.

FIGURE 31 : Transformation logarithmique des valeurs de fluorescence transitoire en fonction de la concentration en DCMU et Ioxynil (échelle arithmétique)



NOTA : L'analyse mathématique de la relation entre concentration en inhibiteur et variations des valeurs transitoires de fluorescence exprimées par $\Delta \phi_{max} - \Delta \phi_I / \Delta \phi max$ en % du témoin ne correspond pas à des fonctions exponentielles quelle que soit la fraction de la courbe étudiée ; en particulier, l'ajustement des courbes expérimentales à une fonction log-normale par les transformations log-probit n'est pas satisfaisant (r = 0,88). Par contre, l'analyse de régression linéaire montre que la fonction la plus probable est logarithmique, et que nous sommes en présence de 2 droites de pentes distinctes (Figure 31). La signification de cette cassure entre deux droites distinctes est à rapprocher de celle émise à titre d'hypothèse dans le paragraphe 3.1.2.2. de ce chapitre (variations des aires complémentaires en fonction de la concentration en inhibiteur).

FIGURE 32. : Evolution des aires totales de complémentarité. A_{max} normalisées à la fluorescence maximale obtenues sur chloroplastes de tabac, en fonction de la concentration en inhibiteurs.

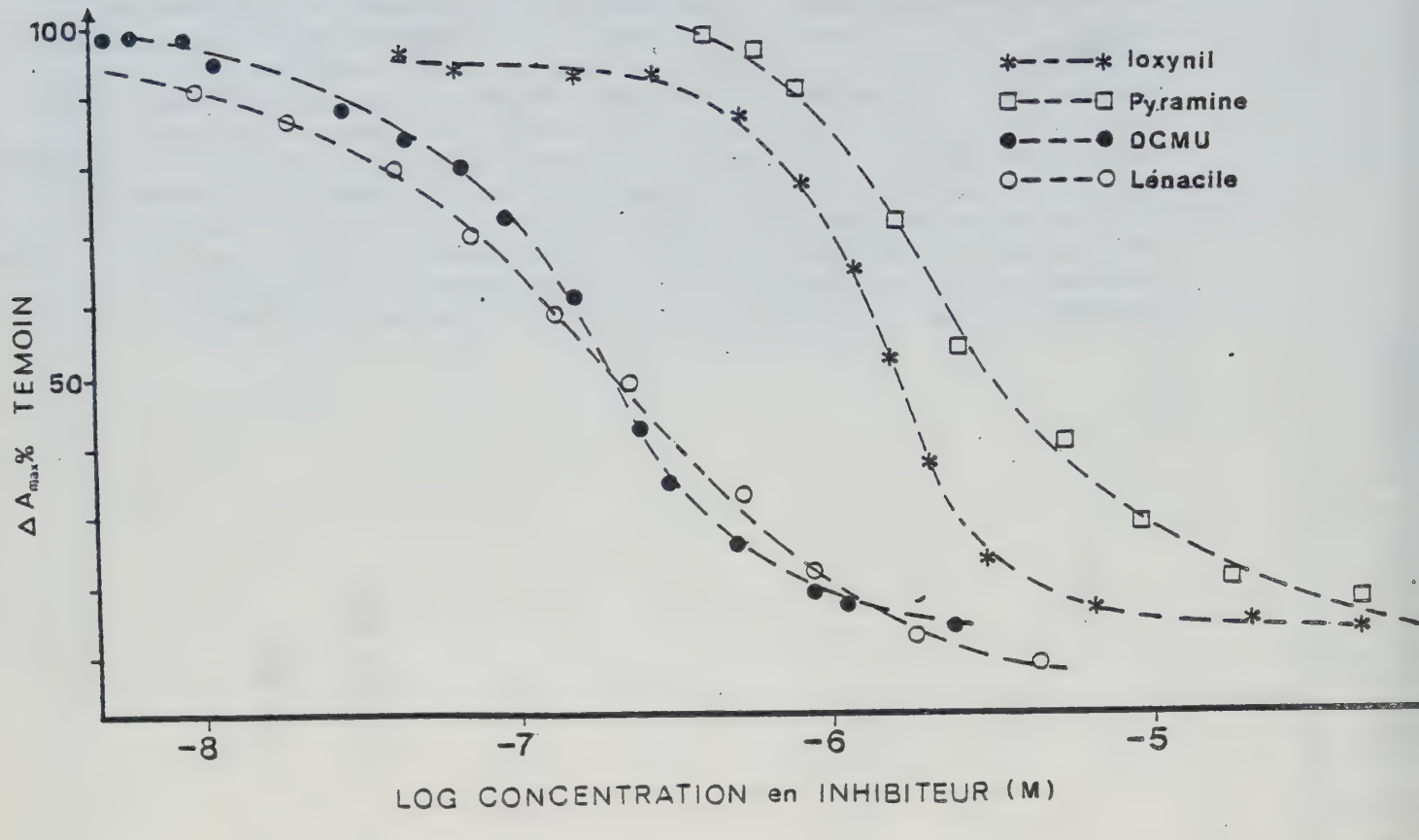


FIGURE 33. : Evolution des aires totales de complémentarité A_{max}, normalisées à la fluorescence maximale, obtenues sur chloroplastes de tabac, en fonction de la concentration en inhibiteurs.

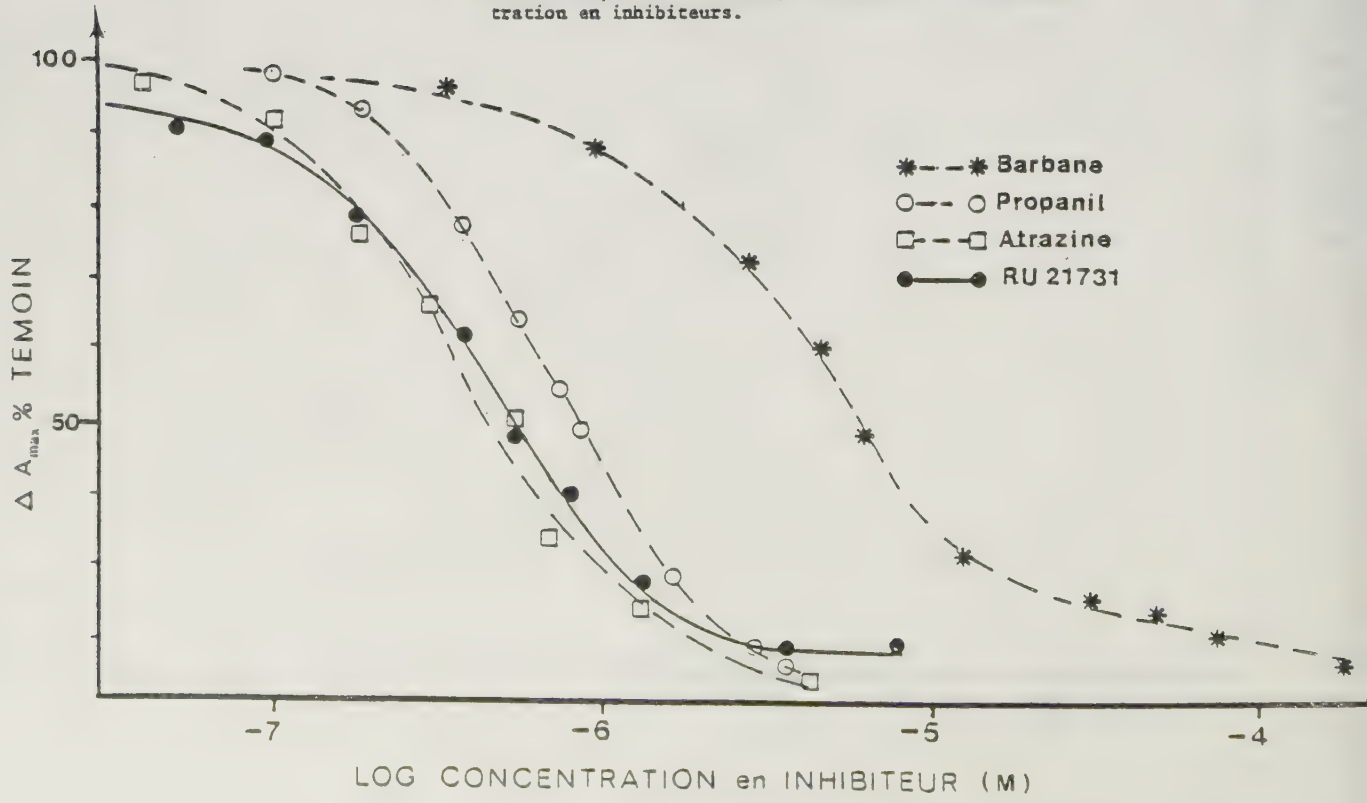


Tableau 13

Comparaison entre les valeurs de demi-effet sur les aires de complémentarités ($pA_{max_{50}}$) et le dégagement d'O_2 (pI_{50}) mesurés sur chloroplastes de tabac, et la réaction de Hill basale ($H_2O \rightarrow$ Ferricyanure) sur chloroplastes de pois

PRODUITS	chloroplastes de tabac		chloroplastes de pois
	$p\,\Delta\,A_{max_{50}}$	pI_{50} dégagement d'O_2 ($H_2O \rightarrow$ ferricyanure)	pI_{50} reduction du ferricyanure
DCMU	6,7	6,78	6,82
Lenacile	6,69	6,23	6,67
Atrazine	6,34	6,49	5,76
Propanil	6,07	6,15	5,29
Ioxynil	5,70	6,20	6,57
RU 21731	6,2	6,30	5,55
Pyramine	5,52	5,43	5,85
Barbane	5,2	4,05	4,0

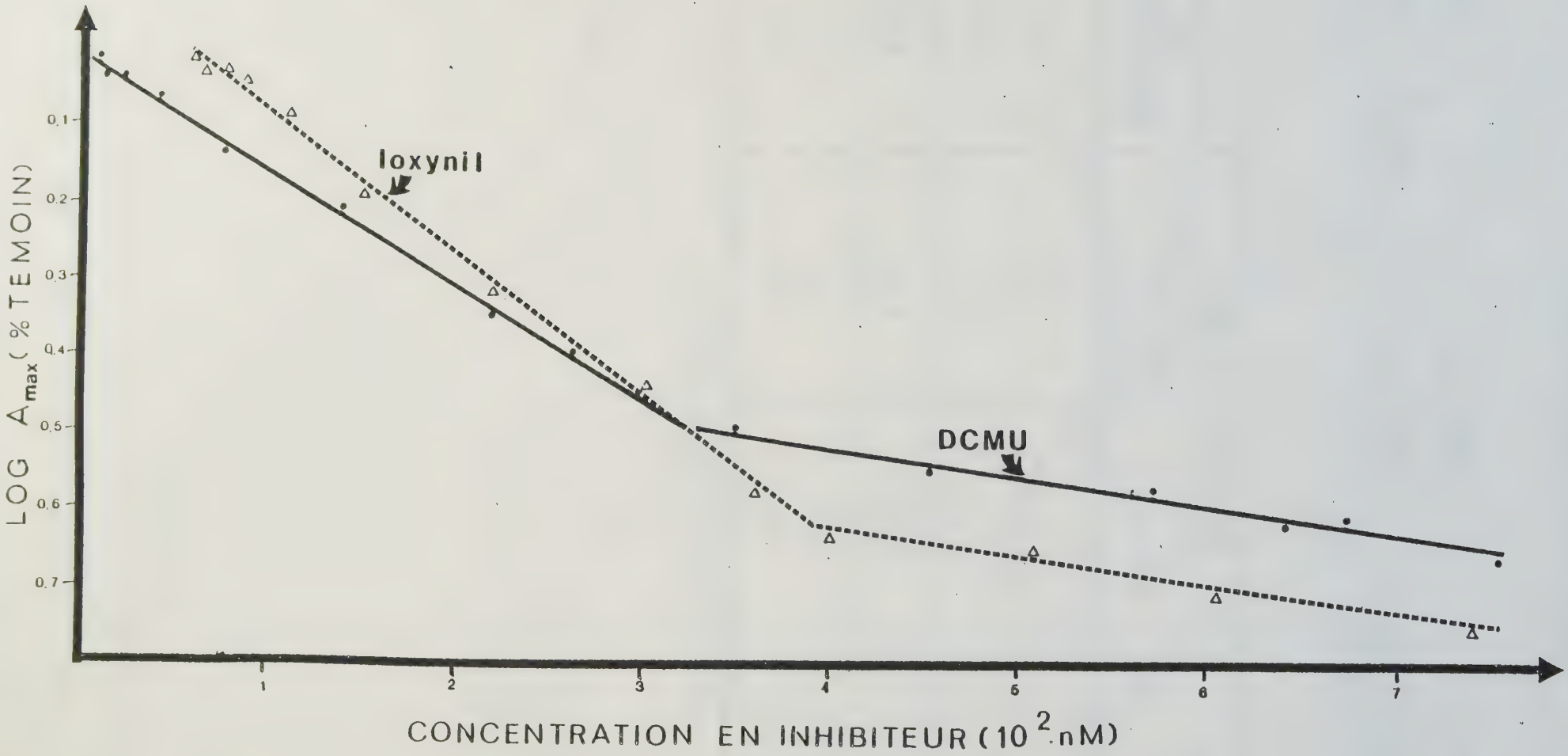


FIGURE 34 : Transformation sur échelle log-arithmétique des valeurs de A_{max} obtenues sur chloroplastes de tabac en présence de DCMU et d'ioxynil

3.2.2.2 - Relation entre la concentration en inhibiteur et les variations d'aires de complémentarité normalisées à la ϕmax.

Bien que les données de la littérature sur la signification des aires complémentaires soient essentiellement disponibles sur chloroplastes isolés, nous avions montré que chez les chlorelles, il existait une relation quantitative entre ces aires et la concentration en inhibiteurs de "type-DCMU". Il était donc naturel d'entreprendre la même étude avec des chloroplastes isolés.
Les aires totales A_{max} sont mesurées à partir des courbes d'induction de fluorescence obtenues avec les chloroplastes intacts de tabac et dont certaines étaient représentées sur la Figure 27. La vitesse de balayage choisie (50 msec/division) permet une évaluation correcte de ces aires totales A_{max}. De plus, il est possible de comparer les variations de A_{max} mesurées sur les chloroplastes en présence d'inhibiteurs, à celles du témoin. Contrairement aux chlorelles, la taille des aires A_{max} décroît avec la concentration en inhibiteurs, ce qui est logique puisque la ϕmax varie peu tandis que la montée de fluorescence est accélérée. Cette contradiction apparente avec les résultats obtenus avec les chlorelles sera discutée plus loin.

Les figures 32 et 33 présentent les courbes reliant les variations de l'A_{max} en fonction de la concentration en DCMU, Lénacile, Atrazine, Propanil, Ioxynil, RU 21731, Pyramine et Barbane. La concentration de demi-effet est mesurée à partir de ces courbes, le co-logarithme de ces valeurs calculées et les $pA_{max_{50}}$ correspondantes présentées dans le Tableau 13, dans lequel les pI_{50} obtenues sur le dégagement d'O_2 par les chloroplastes de tabac et sur la réaction de Hill (chloroplastes de pois), sont comparées. Les résultats obtenus tendent à montrer qu'il existe une bonne corrélation entre les concentrations de demi-effet obtenues sur les A_{max} et les pI_{50} (dégagement d'O_2) sauf pour l'Ioxynil, et dans une certaine mesure, le barbane. Dans le cas de ce dernier produit, les différences évoquées peuvent être fortuites, mais en ce qui concerne l'ioxynil nous retrouvons l'anomalie observée sur les valeurs de la fluorescence transitoire présentées dans le paragraphe 3.2.2.1. Il est donc possible que l'ioxynil ne possède pas un site d'action strictement identique à DCMU.

Comme dans le cas des mesures des niveaux transitoires de fluorescence présentées dans le paragraphe précédent, nous avons recherché une relation mathématique entre la variation des aires A_{max} et la concentration en inhibiteurs.
Un ajustement à une loi log-normale n'est pas approprié, seule la transformation en fonction logarithmique fournit des bons coefficients de corrélation, montrant que nous sommes en présence de 2 droites de pentes différentes (Figure 34).

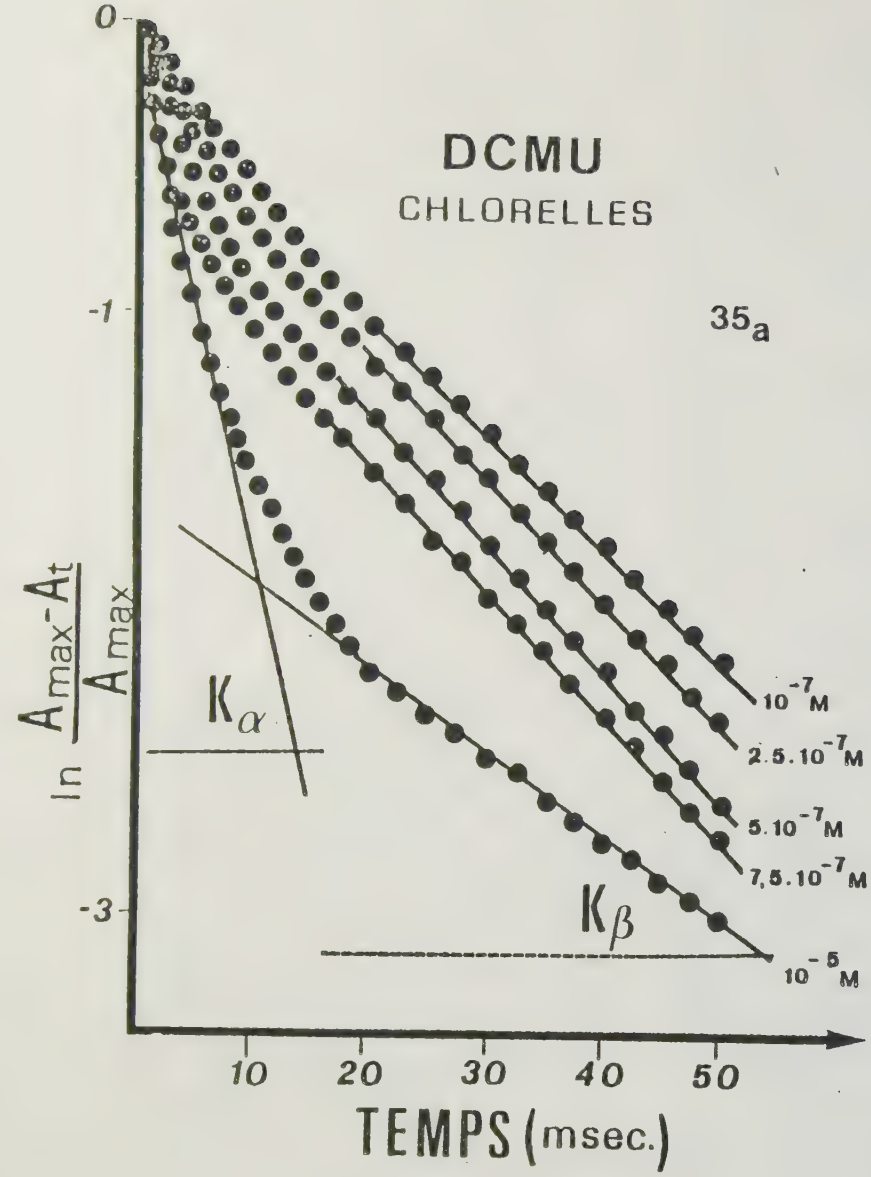
Le raisonnement tenu dans le paragraphe 3.1.2.2. concernant les variations des aires A_{max} sur chlorelles en présence de concentrations croissantes en inhibiteurs de "type-DCMU" peut être appliqué aux chloroplastes ; toutefois, il est bon de comparer les résultats entre les 2 types de matériels photosynthétiques et d'émettre, le cas échéant, certaines réserves.

.3. - Comparaison entre chlorelles et chloroplastes

3.3.1 - Recherche d'une hypothèse commune de la signification des aires de complémentarité normalisées à la fluorescence maximale

Nous avons vu que lorsque la concentration en inhibiteurs de "type-DCMU" augmente, la taille des aires A_{max} croît selon une certaine proportionnalité chez les chlorelles, tandis que cette taille diminue chez les chloroplastes. Par suite, relier la concentration de Q réduit à la taille de l'aire totale de complémentarité A_{max} semble difficile si l'on ne recherche pas à comparer les facteurs qui modulent les rendements de fluorescence de la chlorophylle chez l'algue et le chloroplaste. Chez les chlorelles, le rendement maximal de fluorescence n'est atteint que lorsque Q est totalement réduit, ce qui n'est possible qu'à des concentrations élevées en inhibiteur bloquant la réoxydation de Q par PQ. La fluorescence variable est elle-même contrôlée non seulement par Q, mais aussi par l'état d'oxydo-réduction du donneur primaire d'électrons au PS II (BUTLER, 1972), par l'état du système d'accumulation de charges oxydantes conduisant au dégagement d'O_2(JOLIOT et JOLIOT, 1972) et par un quencher non-photochimique B ou R (VELTHUYS et AMESZ, 1974). Si l'on fait abstraction de l'hypothèse d'une influence des inhibiteurs de "type-DCMU" sur le côté donneur du PS II, il apparait que les rendements de fluorescence de la chlorophylle sont contrôlés par l'état redox des constituants de la chaine de transporteurs d'électrons assurant la connexion entre PS I et PS II. Par suite, la concentration relative de ces constituants, en plus de leur état redox, est modulée par les activités PS II et PS I. Chez les algues, en l'absence d'inhibiteur, le rapport des activités PS I / PS II est vraisemblablement supérieur à celui rencontré dans le chloroplaste, comme en témoigne la cinétique d'induction de fluorescence. Lorsqu'un inhibiteur de "type-DCMU" est ajouté aux chlorelles, deux paramètres évoluent dans des proportions relatives différentes : la vitesse de la montée de fluorescence et le niveau de fluorescence stationnaire. Schématiquement, Q étant réduit par PS II mais réoxydé en partie par le PS I via le pool de substances A, des quantités importantes d'inhibiteurs sont nécessaires pour que le rendement de fluorescence maximal soit atteint, c'est-à-dire que ni la vitesse absolue de la réaction photochimique, ni le niveau de ϕ_{max} ne varient de façon substantielle, ce qui est reflété par une valeur pratiquement constante des aires A_{max} au-dessus d'une concentration-seuil, mise en évidence par l'étude des fonctions "logistiques"(cassure de pentes). Dans le cas du chloroplaste, le rendement maximal de fluorescence est atteint en l'absence d'inhibiteur, l'influence de ce dernier consistant à accélérer la cinétique de montée de fluorescence, tandis que le niveau de ϕ_{max} est identique au témoin ou légèrement inférieur ; une augmentation du rendement maximum de fluorescence indiquerait une influence des inhibiteurs sur le côté donneur du PS II (YAMASHITA et BUTLER, 1968-b).

Enfin, comme cela a déjà été mentionné, le pool de PQ peut posséder, chez le chloroplaste, une propriété de quencher (VERNOTTE et al, 1979).
Par suite, les aires de complémentarité décroissent avec l'augmentation de la concentration en inhibiteurs de "type-DCMU" : l'analyse de la régression obtenue montre que, de même que chez les chlorelles, les A_{max} varient peu en fonction de la concentration en inhibiteur, lorsqu'une certaine valeur-seuil est atteinte et comme en témoigne l'obtention de 2 droites (Fig. 34) de pentes différentes. Nous pouvons, dans le cas des chlorelles, proposer l'hypothèse d'une concentration - seuil au-dessus de laquelle le rendement quantique du centre réactionnel PS II varie dans le même sens que la fraction active de l'absorption lumineuse (voir : § 3.1.2.2. et ETIENNE et al, 1974). Il est toutefois possible que ce seuil ne représente qu'une limite de concentration au-dessus de laquelle les réactions inverses sont bloquées, de sorte que seule la vitesse de réduction de Q soit observée : pour lever cette ambiguïté, il serait intéressant d'effectuer les mêmes essais en s'assurant qu'un seul "turn-over" s'opère, par exemple en excitant le matériel photosynthétique par un éclair actinique très puissant et de courte durée.



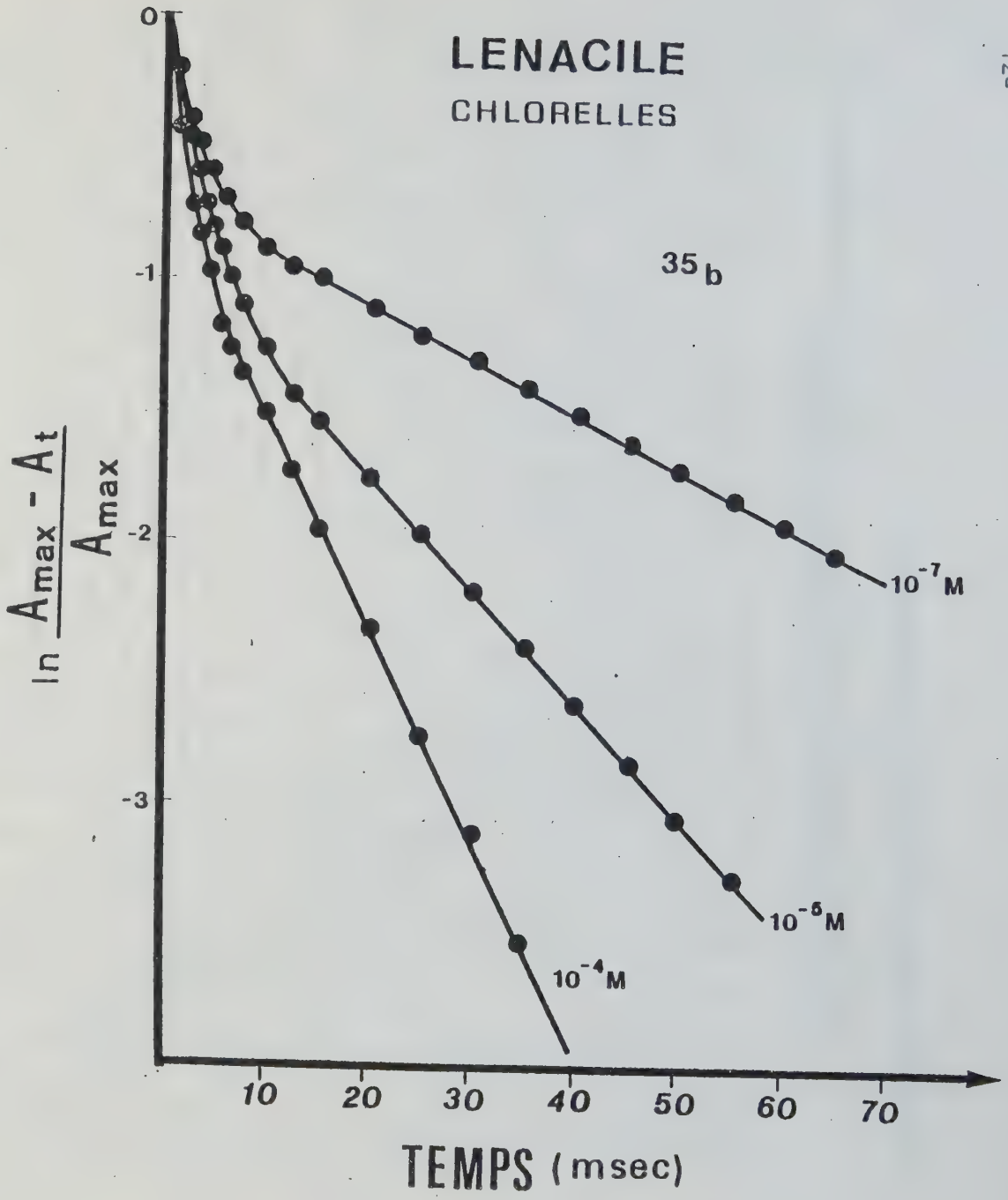


FIGURE 35 - Traitement cinétique de réaction du ler ordre de l'accumulation des aires de complémentarité normalisées à la ϕmax en fonction du temps, mesurée sur chlorelles (*30 γ Chl/ml, énergie d'excitation : 85 μEinstein/m^{-2}/sec^{-1}*) en présence de DCMU (35-a) et de lénacile (35-b)

En ce qui concerne l'Ioxynil, il est possible que cet inhibiteur possède, aussi bien chez la chlorelle que chez le chloroplaste, des propriétés différentes de DCMU, ou un deuxième site d'action, puisque la concordance entre les valeurs de demi-effet sur les A_{max}, les fluorescences transitoires (sur chloroplastes seulement) et les pI_{50} (réaction de Hill), n'est pas bonne.
Toutefois, d'autres méthodes doivent être envisagées pour essayer de répondre à cette question.

3.3.2. - Cinétiques d'accumulation de l'aire de complémentarité normalisée à la ϕ max ; recherche d'un modèle explicatif utilisant des méthodes d'étude par mécanique quantique de la PQ

Nous avons jusqu'ici étudié l'effet des inhibiteurs sur les variations d'aires totales de complémentarité A_{max}. La taille de ces aires représente une mesure du nombre total de quanta utilisé par le PS II durant la période d'induction.
MELIS et HOMAN (1975) proposent que la croissance des aires A_t reflète l'évolution des évènements photochimiques. En d'autres termes, chaque segment A_t donné par la relation :

$$A_t = \int_{t_1}^{t_2} \left[\Phi_{max} - \Phi_{(t)} \right] dt$$

est proportionnel en nombre de séparations de charges photochimiques dans l'intervalle de temps t_2-t_1. L'analyse de la cinétique de croissance de A_t montre, en admettant que l'on soit en présence d'une loi du premier ordre de la forme :

$$\frac{dA}{dt} = k \left[A_{max} - A_{(t)} \right]$$

que l'on est en présence d'un phénomène biphasique dont les constantes de vitesse sont k_α et k_β - correspondent à deux composantes appelées α (rapide) et β(lente).

Nous avons repris cette méthode en découpant et en pesant les tranches de A_t pour chaque intervalle de temps $t_2 - t_1$ (5 msec chez les chlorelles, 25 msec chez le chloroplaste) et en portant sur un graphique les valeurs de $\ln \frac{A_{max} - A(t)}{A_{max}}$ en fonction du temps.
Les résultats obtenus avec les chlorelles, en présence de 4 concentrations en DCMU proches de la pI_{50}, sont présentés sur la Figure 35-a.
Nous observons qu'aux concentrations voisines de la pI_{50} (ou de la pSA_{max50}), la pente des droites (échelle logarithmique) de la composante rapide α varient avec la concentration en DCMU, tandis que la pente des droites représentant la composante lente β est identique. Seule une concentration élevée en inhibiteur fait varier aussi bien les vitesses des phases α et β . Nous avons vérifié avec d'autres inhibiteurs de "type-DCMU", la dépendance de la concentration aux inhibiteurs de ces 2 phases (Figure 35 -b : exemple du Lénacile).

Ces résultats sont en opposition avec ceux de VIERKE (1978), obtenus sur chlorelles, en ce qui concerne la phase β puisque l'auteur note une accélération de cette dernière par rapport à la phase α et non un ralentissement. Cependant, cette observation n'a reçu aucune explication de la part de l'auteur.

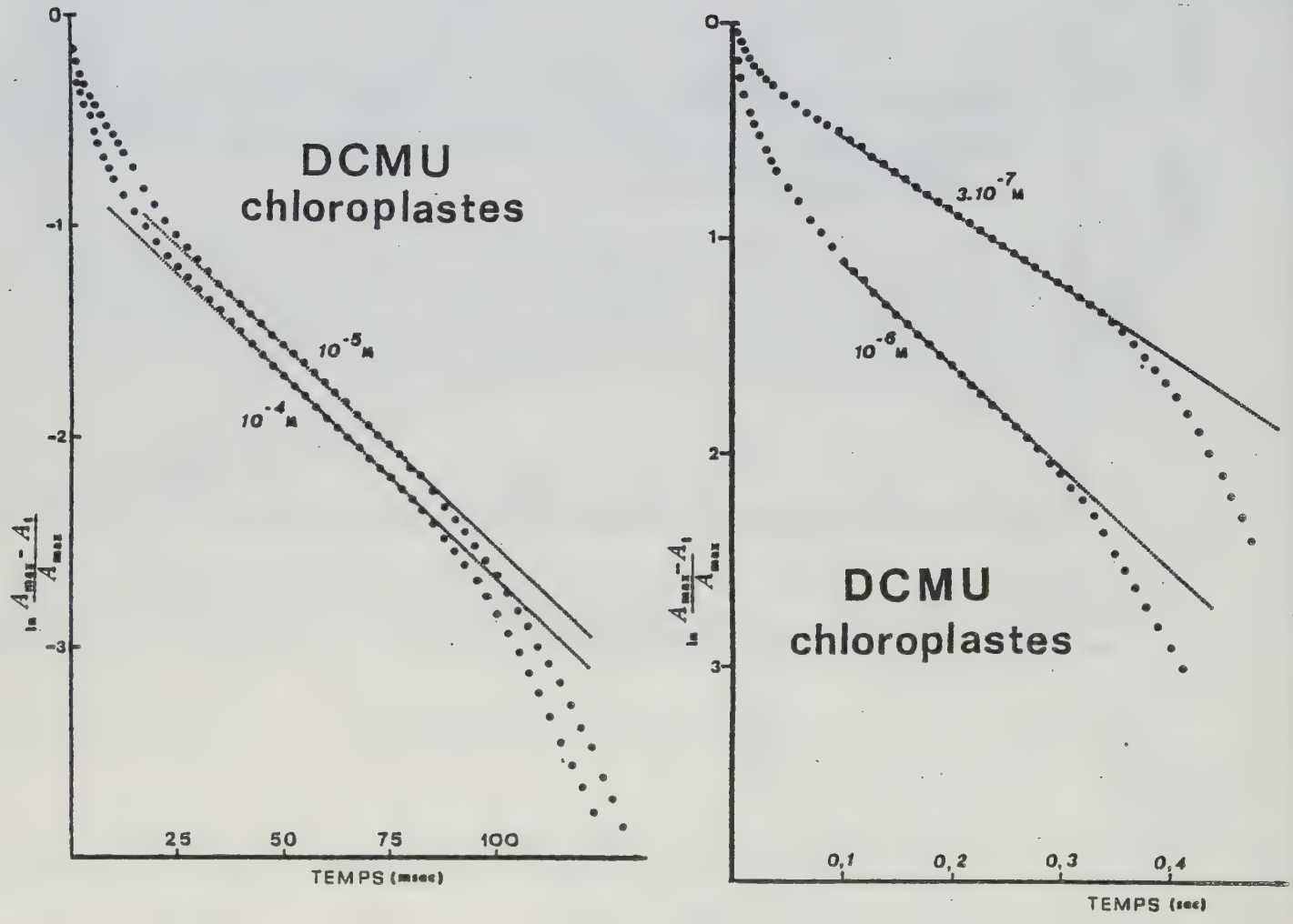


FIGURE 36 - Traitement cinétique de réaction du 1er ordre de l'accumulation des aires de complémentarité normalisées à la ϕmax en fonction du temps, mesurée par chloroplastes de tabac (30 γ *chlorophylle/ml, énergie d'excitation : 85 µ Einstein/m²/sec*)

Par ailleurs, nous retrouvons chez la chlorelle, la biphasicité de cinétiques d'accumulation des aires A_t observée sur le chloroplaste bien que les vitesses soient différentes. La présence de deux phases a été interprétée comme étant le reflet de l'existence de 2 types photocentres possédant des efficacités photochimiques différentes (MELIS et HOMAN, 1975 - JOLIOT et JOLIOT, 1964, 1971) ; ces 2 types photocentres α et β pourraient être séparés spatialement l'un de l'autre dans la membrane du thylacoïde et présenter des propriétés cinétiques de conversion d'énergie photochimique et de stabilisation de charge différentes (MELIS et DUYSENS, 1979). Alternativement, une autre hypothèse a été avancée, pouvant justifier l'existence des 2 phases mentionnées : selon JOLIOT et JOLIOT (1977), chaque photocentre de PS II comprendrait 2 accepteurs d'électrons Q_1 et Q_2, cette propriété ayant été mise en évidence par des techniques différentes. MELIS et SCHREIBER (1979) montrent par ailleurs que les changements de rendements de fluorescence, la variation de DO à 550 nm et la réduction de Q suivent des cinétiques identiques.

Nous reviendrons sur l'intérêt de cette hypothèse.

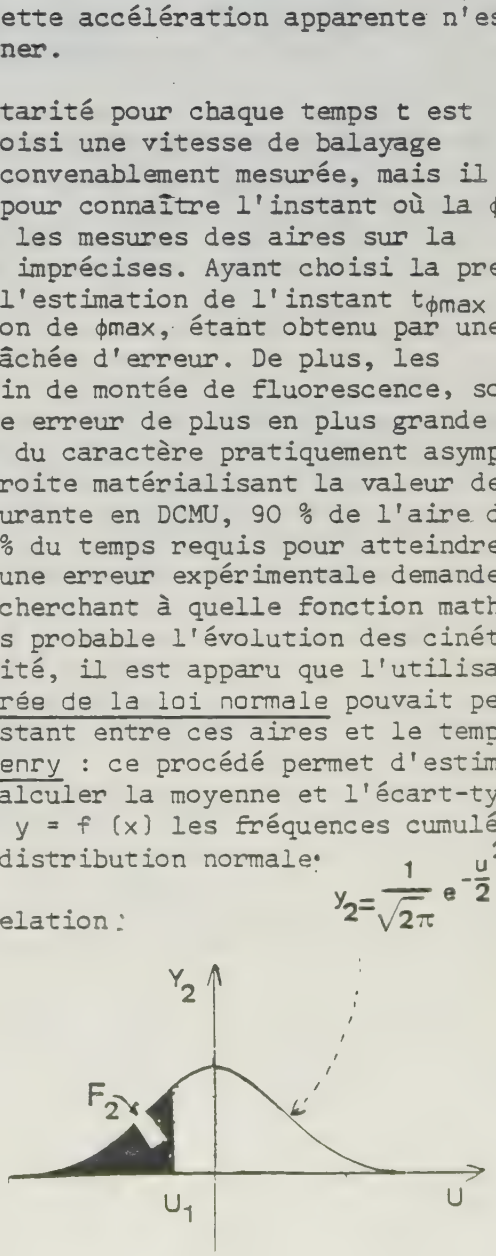
En ce qui concerne le chloroplaste, des résultats inattendus sont observés : pour tous les inhibiteurs de "type-DCMU", l'allure des courbes desquels est identique et est représentée à titre d'exemple avec différentes concentrations en DCMU sur la Figure 36 : on note la présence des phases α (rapide) et β (lente), comme chez les chlorelles, mais au-delà d'une certaine valeur, on voit apparaître une accélération de la cinétique d'accumulation des aires de complémentarité. L'observation visuelle des courbes de fluorescence obtenues en présence d'inhibiteurs de "type-DCMU" suggère que cette accélération apparente n'est qu'un artéfact dont l'origine reste à déterminer.

La technique de mesure des aires de complémentarité pour chaque temps t est relativement imprécise ; en effet, si l'on choisi une vitesse de balayage rapide, la montée rapide de fluorescence est convenablement mesurée, mais il est nécessaire d'effectuer une extrapolation pour connaître l'instant où la ϕ_{max} peut être obtenue expérimentalement, mais les mesures des aires sur la montée rapide de fluorescence deviennent très imprécises. Ayant choisi la première méthode, il faut garder à l'esprit que l'estimation de l'instant $t_{\phi max}$ correspondant au temps nécessaire à l'obtention de ϕmax, étant obtenu par une extrapolation graphique, est certainement entâchée d'erreur. De plus, les aires de complémentarité mesurées durant la fin de montée de fluorescence, sont de plus en plus réduites, ce qui résulte en une erreur de plus en plus grande à mesure que l'on se rapproche de ϕmax, du fait du caractère pratiquement asymptotique de la fluorescence variable avec la droite matérialisant la valeur de ϕmax (on note que, pour une concentration saturante en DCMU, 90 % de l'aire de complémentarité est accumulée en moins de 20 % du temps requis pour atteindre ϕmax). Toutefois, l'observation subjective d'une erreur expérimentale demande une analyse plus formelle du phénomène. En recherchant à quelle fonction mathémathique peut correspondre de la façon la plus probable l'évolution des cinétiques d'accumulation des aires de complémentarité, il est apparu que l'utilisation de l'équation décrivant la forme réduite centrée de la loi normale pouvait permettre d'estimer correctement la relation existant entre ces aires et le temps. Cette description fait appel à la droite de Henry : ce procédé permet d'estimer l'ajustement à une loi normale dont on peut calculer la moyenne et l'écart-type. Si l'on considère une distribution quelconque $y = f(x)$ les fréquences cumulées correspondent à $F_1 = \int_{\infty}^{x_1} f(x)\,dx$; pour une distribution normale : $y_2 = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{u^2}{2}}$

les fréquences cumulées sont données par la relation :

$$F_2 = \int_{-\infty}^{U_1} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{u^2}{2}}\,du$$

correspondant à l'intégrale de la loi normale →



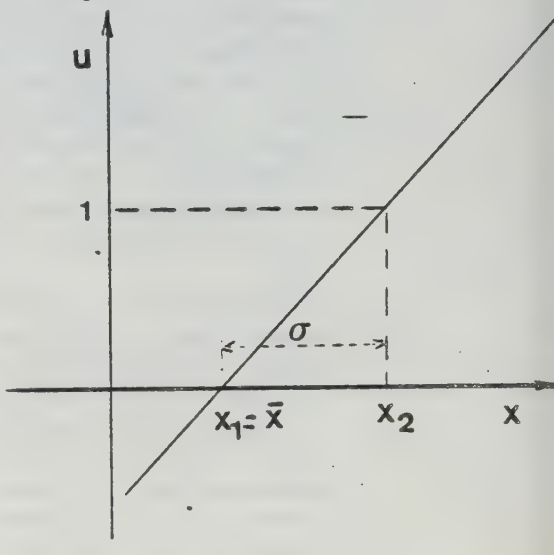
En recommençant un très grand nombre de fois et en comparant les valeurs $F_1 = F_2$ on note les valeurs des couples correspondants (x_i, u_i).

En portant sur 2 axes de coordonnées les couples (x_i, u_i), il apparaît qu'une relation linéaire existe entre u et t , du type $u = \frac{x-a}{b}$ de dérivée $dt = \frac{x}{b}$. Or, nous savons que $F_1 = F_2$ pour un couple (x-u) donné, ce qui permet d'écrire :

$$F_1 = \int (f\,x)dx = F_2 = \int \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{u^2}{2}} . du = \int \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\left(\frac{x-a}{2b^2}\right)^2} . \frac{dx}{b}$$

Par suite, on peut dire que f (x) est une fonction normale, de moyenne a et d'écart-type b. Si l'on écrit u = 0 on obtient $\frac{x - \bar{x}}{\sigma} = 0$ et $x = \bar{x}$

On lira sur le graphique ci-contre la valeur de $x = \bar{x}$; par ailleurs, en prenant u = 1, $x = x_2$ de sorte que $u = \frac{x - \bar{x}}{\sigma}$, $\sigma = x - \bar{x}$ ce qui par suite nous donne $x_2 - x_1$ = écart-type σ.



Des tables ont été calculées, à partir de l'équation de la forme réduite centrée de la loi normale :

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{u^2}{2}}$$

reliant u à y et à $\int_0^u y\,du$

En termes concrets, si l'on appelle y la valeur de fluorescence variable normalisée à la φmax pour chaque instant t (Figure 37-a, en encadré dans la Figure 37), il est possible de savoir si l'on utilise l'équation de la forme réduite de la loi normale, ce qui permet de construire les droites correspondantes à l'évolution de la fluorescence variable en fonction du temps. Les droites obtenues sont représentées sur Figure 37, d'où l'on peut tirer les conclusions et éléments suivants :

- La cinétique de montée de fluorescence normalisée à la φmax est un phénomène biphasique, chaque phase obéissant à une loi normale (coefficients de corrélation 0,99).

- La courbe observée s'écarte progressivement de la droite calculée entre 100 msec et tφmax. (cette erreur est illustrée par la zone ombrée sur la Figure 37) : on peut en effet estimer l'instant t où la φmax sera atteinte, puisque u varie de 0 à 3,5 - cette dernière valeur correspondant à 99,95 % de la distribution totale.

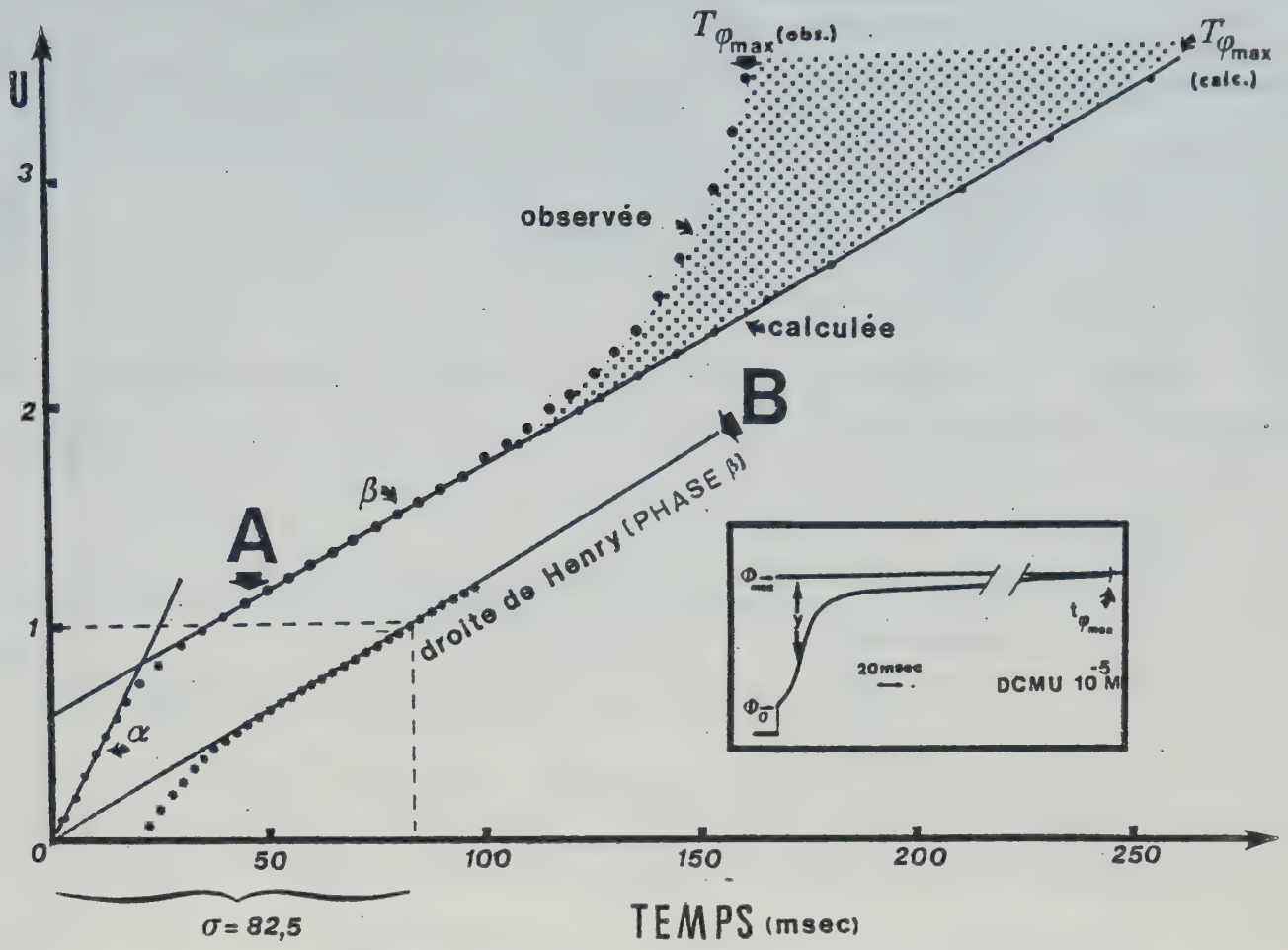


FIGURE 37 - Droites A_α et A_β :

Représentation par la droite de Henry de la cinétique de fluorescence mesurée sur chloroplastes de tabac pour une concentration en DCMU de 10^{-5} M (valeurs présentées sur la figure 36).
Sur l'axe des ordonnées u correspond à la variable de l'intégrale de la forme réduite centrée de la loi normale :

$$F = \int \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{u^2}{2}} du$$

et varie par définition de 0 à 3,5. Les valeurs observées et calculées se confondent jusqu'à environ un instant t = 110 msec, à partir duquel la courbe expérimentale s'écarte fortement de la droite théorique.
La zone ombrée indique l'erreur entre ces 2 courbes, jusqu'à une valeur correspondant à u = 3,5 à laquelle T_ϕ max (observé) et T_ϕ max (calculé) sont obtenus.
La droite B permet le calcul des valeurs théoriques de y (Fig. 36-a) pour chaque instant t à partir de l'estimation graphique de σ lorsque u = 1.

- En admettant que la ϕmax est atteinte lorsque u = 3,5 on obtient graphiquement un $t_{\phi max}$ calculé = 270 msec.

  En utilisant la droite de Henry pour la phase β (droite inférieure sur Figure 37) et en posant u = 1, il est possible de calculer l'écart-type de la distribution ; celui-ci est égal à σ = 82,5.

  En utilisant l'équation de la loi normale :

$$Y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\frac{u^2}{\sigma^2}}$$

  et en posant par définition $u = \frac{x - m}{\sigma}$, il est possible de calculer y.

  A $t_{\phi max}$ (obs) = 160 msec, y = 0,001, tandis qu'à t = 250 msec (très proche de $t_{\phi max}$ calculée = 270 msec) y = 0,00005

  En d'autres termes, à 150 msec la ϕmax n'est pas atteinte, alors qu'à 250 msec, la valeur de la fluorescence variable est pratiquement asymptotique de la droite matérialisant ϕmax.

  On peut donc retenir $t_{\phi max}$ = 270 msec comme hautement probable.

Il est par suite possible de procéder de même pour tous les inhibiteurs de "type-DCMU" et pour chaque concentration désirée. De plus, nous avons effectué le calcul des aires A_t pour chaque segment t_1, t_2, t_n en utilisant les y corrigés par la méthode ci-dessus, en posant :

$$y_c = \phi_{max} - \phi_t \text{ (corrigés) soit :}$$

$$A_t = \int_{t_1}^{t_2} (y_c)\, dt$$

A titre d'exemple, les droites obtenues de cette façon sont représentées sur la Figure 38 pour 2 concentrations en DCMU ; il faut souligner que par définition A_{max} variant de 0 (au temps t = 0) à 1 (au temps $t_{\phi max}$) le rapport $\frac{A_{max} - A_t}{A_{max}}$ devient $1 - \frac{A_t}{A_{max}}$

En conclusion : les cinétiques de croissance des aires de complémentarité normalisées à la ϕmax sont du 1er ordre et présentent 2 phases aussi bien chez les chlorelles que le chloroplaste. Ces observations correspondent aux résultats proposés par MELIS et HOMAN sans qu'il ne soit possible d'apporter un support expérimental à l'hypothèse formulée par les auteurs, selon laquelle la biphasicité observée serait due à la présence de 2 photocentres PS II possédant des propriétés différentes de rendement de piégeage d'excitation et de stabilisation de charge (MELIS et HOMAN, 1975 - MELIS et DUYSENS, 1979). Il semble plus raisonnable d'imaginer une hétérogénéité du côté accepteur du PS II rendant compte de la présence des 2 phases mentionnées.

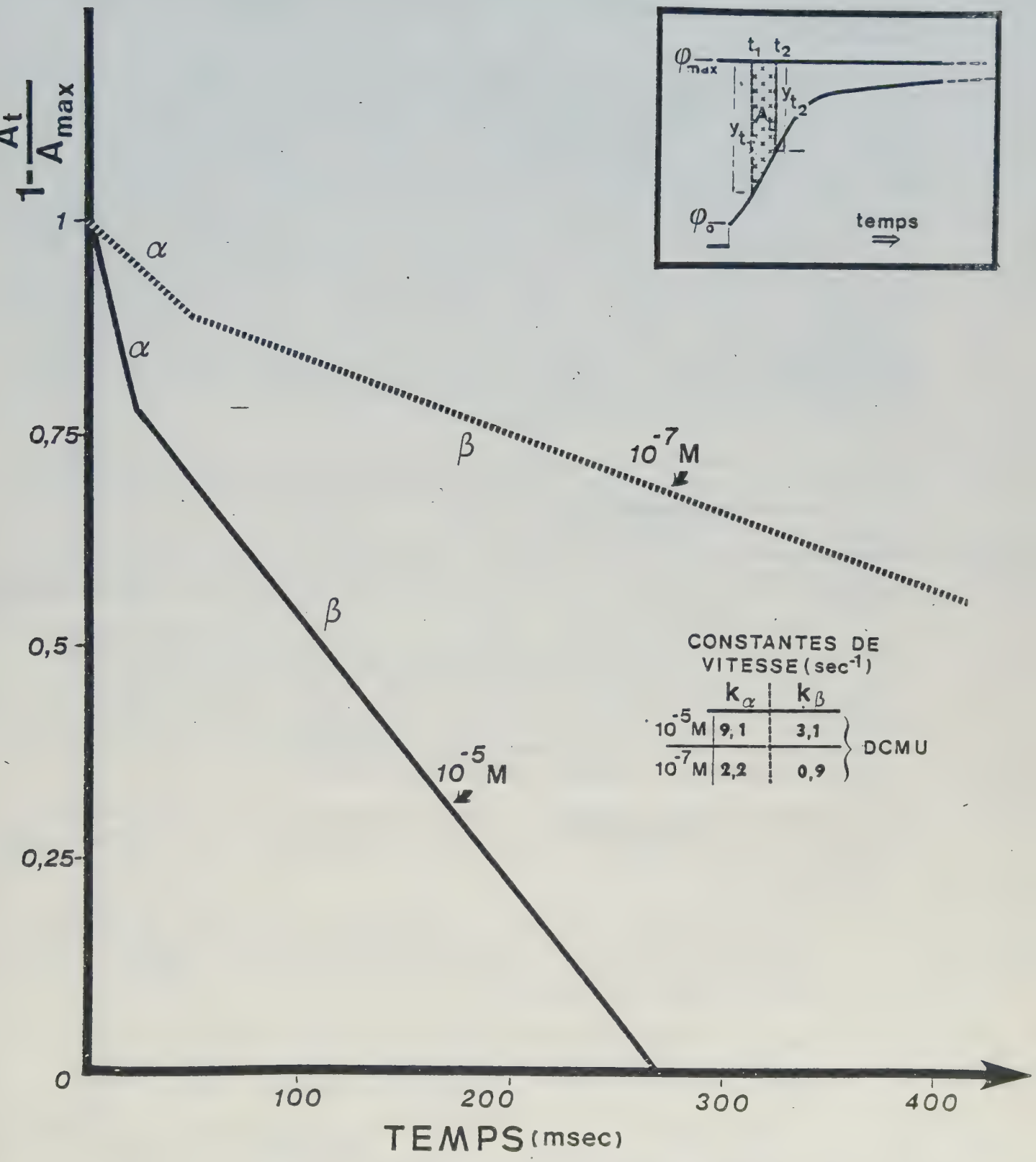


FIGURE 38 - Cinétiques d'accumulation des aires de complémentarité normalisées à la ϕmax pour 2 concentrations en DCMU. Les valeurs de A_t sont calculées à partir des y_t corrigés par l'utilisation de la droite de Henry et obtenues à partir de l'équation :

$$A_t = \int_{t_o}^{t_n} (y_c)\,dt$$

Le rapport A_t/A_{max} correspond en réalité à la variable de l'intégrale de la loi normale centrée réduite.

Evaluation de la faculté de réduction de la PQ par la méthode des orbitales moléculaires: support théorique à l'hypothèse de l'hétérogénéité du côté accepteur du PS II

Il a été démontré que le côté accepteur du PS II était constitué d'un accepteur primaire Q, et d'un accepteur secondaire B (BOUGES-BOCQUET, 1973 - VELTHUYS et AMESZ, 1974). Ces deux accepteurs sont des molécules de plastoquinone (PULLES et al, 1976) dont l'état redox varie : en effet, Q ne peut accepter qu'un seul électron, tandis que B est capable d'en accepter deux (VAN BEST et DUYSENS, 1975). Nous avons recherché un modèle dans lequel il est possible de démontrer que la PQ peut accepter 1 ou 2 électrons. Pour cela, il a été fait appel à une description de la molécule de PQ par la méthode des orbitales moléculaires (P. CARLES, 1979). La molécule, dans son état fondamental, est représentée par une fonction décrivant les mouvements des électrons dans le champ des noyaux des atomes placés dans une position supposée fixe. Ceci implique la connaissance des distances intératomiques, des angles de valences et de torsion de la PQ. L'étude a donc été limitée à une quinone pourvue d'un ou deux enchaînements isopréniques (PQ_1 et PQ_2 respectivement). La méthode de calcul est semi-empirique et correspond à la technique CNDO modifiée (complete Neglected Differential Overlap) permettant une bonne estimation des états excités.

Dans l'état fondamental, la molécule étudiée étant neutre, les électrons se répartissent par paires sur les orbitales moléculaires. Celles-ci, vacantes dans l'état fondamental, permettent de définir des états excités au cours d'une réaction par acceptation d'un électron.
L'orbitale moléculaire la plus élevée et doublement occupée, elle correspond au premier potentiel d'ionisation de la molécule. Elle caractérise le pouvoir donneur d'électron de la molécule et est appelée HOMO *(Highest Occupied Molecular Orbital)*.

La première orbitale moléculaire vacante est associée à l'affinité électronique de la molécule, donc à sa capacité d'accepter un électron ; elle est nommée LEMO *(Lowest Empty Molecular Orbital)* ou LUMO *(Lowest Unoccupied Molecular Orbital)*. Si nous admettons que le côté réducteur du PS II est constitué par des molécules de plastoquinone présentes sous des états redox différents, nous pouvons essayer de décrire la capacité d'acceptation ou de donation d'électron (s) par la mesure des énergies ε des orbitales moléculaires.

En se limitant à la PQ possédant seulement 2 enchaînements isopréniques (PQ_2), il est possible de reporter sur un diagramme (Figure 39) les énergies ε des orbitales moléculaires, à partir duquel il est possible de tirer les conclusions suivantes :

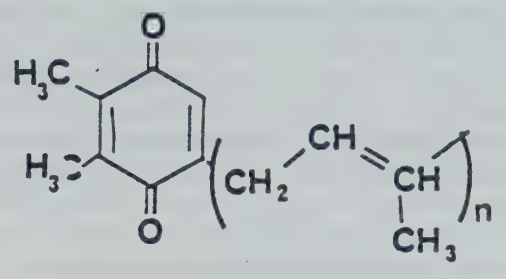
- le passage direct de PQ à PQ^{--} est hautement improbable, puisque le transfert de 2 électrons requerrait une différence d'énergie d'environ 12 eV soit près de 300 Kcalories. Par conséquent, la transition par un état PQ^- semble obligatoire.

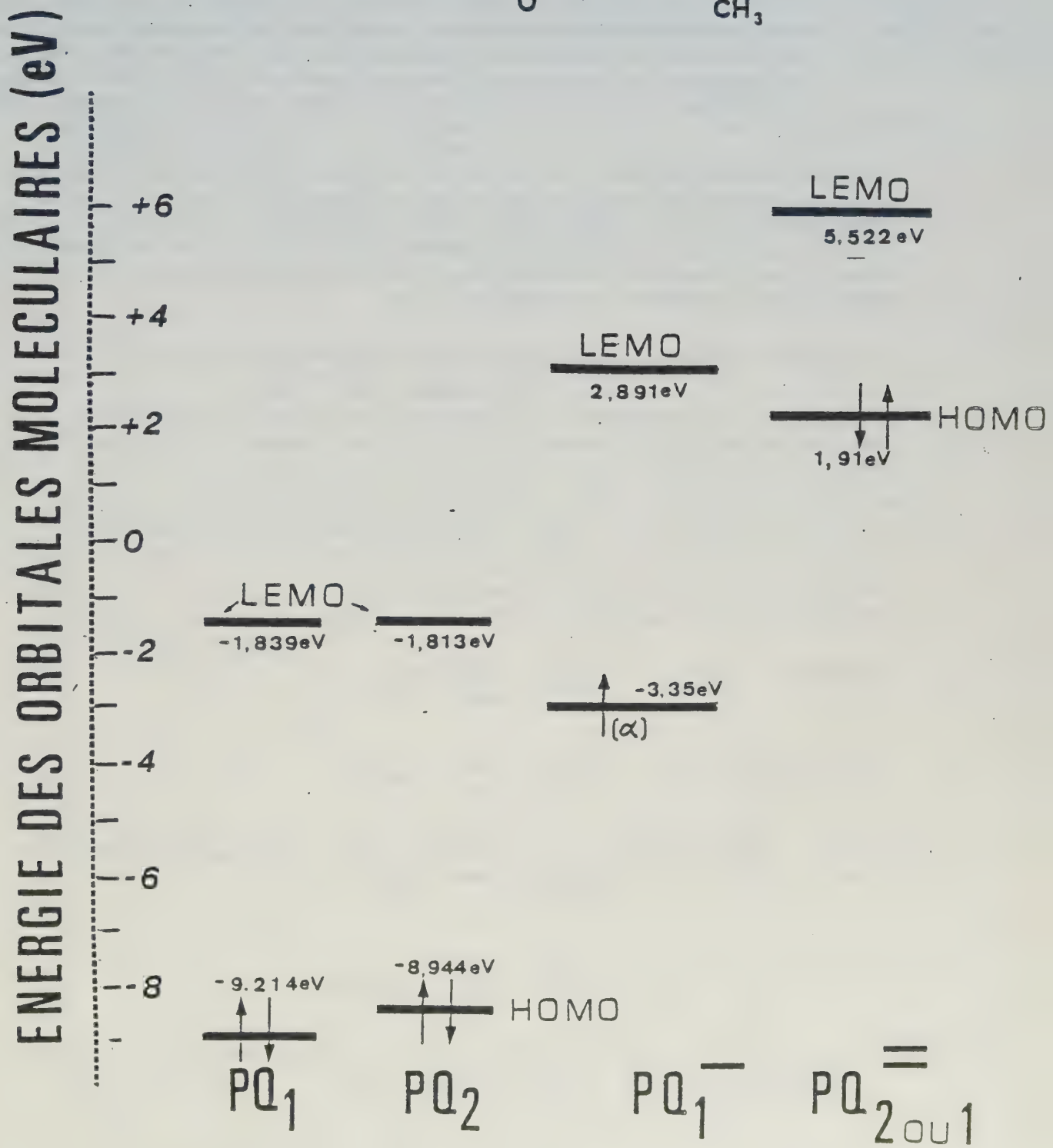
- dans le système $PQ \rightleftharpoons PQ^- \rightleftharpoons PQ^{--}$, l'énergie HOMO de la PQ oxydée indique que la molécule ne peut donner d'électron ; par contre, son niveau d'énergie LEMO est favorable à l'acceptation d'un électron

- L'énergie requise à la transformation $PQ \longrightarrow PQ^-$ correspond à ε HOMO PQ - ε LEMO PQ^- = 6 eV (soit 138 Kcal.). Pour obtenir le passage de l'anion semi-hydro-quinonique PQ^- à la PQ réduite (PQ^-), l'énergie nécessaire est légèrement inférieure (ε = 5 eV ou 115 Kcal).

.. / ..

FIGURE 39 : Energies des orbitales moléculaires obtenues pour une quinone substituée avec 1 ou 2 enchaînements isoprènes à divers états de réduction





- L'effet donneur d'électron augmente de PQ à PQ^-. Cette dernière molécule possède en effet une orbitale ne possédant qu'un électron, la forme la plus probable étant de spin α.

- La PQ^{--} n'est plus accepteur d'électrons mais est donneur à une molécule dont le niveau d'énergie de l'HOMO devrait se situer dans la région de + 5 à + 6 eV ; toutefois, la structure exacte de cette susbtance n'étant pas déterminée, l'étude de ses orbitales moléculaires n'a pas été faite.

- Le mécanisme le plus probable d'échange d'électrons entre des formes oxydée, semi-réduite et réduite de PQ, est la formation de complexes de transfert de charges reversibles. Bien que controversée, l'importance de complexes de transfert de charge a souvent été proposée dans les phénomènes biologiques (PULLMAN et PULLMAN 1960, SZENT-GYORGYI 1960).

Ces informations peuvent être traduites en termes biophysiques en rappelant que le centre réactionnel PS II contient un complexe d'accepteurs QB (ou QR) (BOUGES-BOCQUET 1973, VELTHUYS et AMESZ 1974, VAN BEST et DUYSENS 1975) constitué d'une molécule ne tranférant qu'un électron (Q), et d'un accepteur secondaire B (ou R) capable d'accepter deux électrons successivement et de les transférer au pool tertiaire plastoquinonique A.

Il est donc tentant d'identifier PQ de notre modèle à Q, et PQ^{--} à B^{--}.

Considérant cette analogie, la séquence des réactions de réduction de QB, abstraction faite du côté donneur du PS II et en l'absence d'inhibiteurs de type DCMU peut s'écrire :

Reduction monovalente $Q\,B \xrightarrow{h\nu} Q^-\,B$ (1)

Formation d'un CTC $Q^-B \rightleftharpoons Q^{-}\cdots B$ (2)

Transfert de charge $Q^{-}\cdots B \rightleftharpoons Q\cdots B^-$ (3)

Réduction divalente $Q\cdots B^- \xrightarrow{h\nu} Q^{-}\cdots B^-$ (4)

Transfert d'une charge $Q^{-}\cdots B^- \rightleftharpoons Q\cdots B^{--}$ (5)

Transfert de 2 charges dissociation du CTC,QB $Q\cdots B^{--} \longrightarrow Q\;B$ (6)

$A \qquad A^{--}$

(Q....B) *indique la formation d'un complexe de transfert de charge* (CTC)

La réaction 1 correspond à la réduction monovalente de Q par le PS II (nous n'avons pas la preuve de l'existence d'un complexe de transfert de charge entre le donneur d'électrons au PS II et Q). Les réactions 2 et 3 représentent la formation d'un complexe de transfert de charge (CTC) et la réduction monovalente de B, respectivement.

Pour des raisons de clarté, les réactions ont été séparées, mais il est évident que dans le chloroplaste éclairé en lumière continue, et non par éclairs, ces séquences se poursuivent simultanément. En effet, dès qu'une certaine quantité de QB^- a été formée, Q est capable d'accepter un électron et de le transférer à B (réactions 4 et 5). Enfin, ces 2 électrons sont transférés au pool plastoquinonique de A, vraisemblablement selon un mécanisme mettant en jeu un CTC (réaction 6)

En présence de DCMU, ou d'inhibiteurs du même type, l'équilibre des réactions suivantes est déplacé vers la gauche :

$$Q^-\cdots B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} Q\cdots B^- \qquad (7)$$

$$Q^-\cdots B^- \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} Q\cdots B^{--} \qquad (8)$$

En effet, non seulement Q peut être réduit par B^- (réaction 7) en présence d'inhibiteurs de type DCMU (VELTHUYS et AMESZ, 1974) mais également par B^{--} (réaction 8) (GOVINDJEE et al, 1976).

Toutefois, si l'on identifie Q et B à des molécules de PQ à l'état PQ^- et PQ^{--}, respectivement :

$$Q\,B \xrightarrow{h\nu} Q^-\cdots B \rightleftharpoons Q\cdots B^- \;\#\; PQ\cdots PQ \xrightarrow{h\nu} PQ^-\cdots PQ \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} PQ\cdots PQ^- \qquad (9)$$

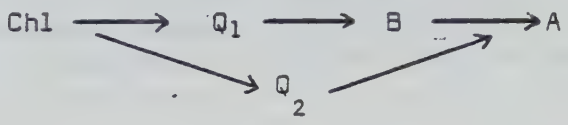
$\epsilon = 138$ Kcal

$$Q\,B^- \xrightarrow[h\nu]{} Q^-\cdots B^- \rightleftharpoons Q\cdots B^{--} \;\#\; PQ\cdots PQ^- \xrightarrow{h\nu} PQ^-\cdots PQ^- \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} PQ\cdots PQ^{--} \qquad (10)$$

$\epsilon = 115$ Kcal

il devient difficile d'expliquer une phase ß relativement lente succédant à la phase α (rapide) puisque l'énergie requise pour la réduction monovalente de PQ (ϵ = 138 Kcal) est supérieure à la réduction divalente (ϵ = 115 Kcal).

En gardant à l'esprit que ces réactions sont reversibles, leur constante d'équilibre est impossible à déterminer par les méthodes décrites dans ce travail. Par contre, l'hypothèse proposée par JOLIOT et JOLIOT (1977) est beaucoup plus séduisante : les auteurs suggèrent en effet l'existence de 2 accepteurs primaires d'électrons du PS II, Q_1 et Q_2, connectés à B. A ce stade, on peut soit considérer, comme le font JOLIOT et JOLIOT, que Q_2 est mieux protégé du milieu extérieur que Q_1, soit que l'un des quenchers n'est pas relié à B (WOLLMAN, 1978), selon le schéma :



(11)

Dans ces conditions, la séquence Chl Q_2 A serait moins sensible aux inhibiteurs de "type-DCMU". Cette dernière hypothèse fournit une explication plus cohérente des 2 phases obtenues expérimentalement. Les cinétiques d'accumulation des aires de complémentarité normalisées à la ϕmax seraient donc contrôlées non seulement par les vitesses d'oxydation de Q et B (des molécules de plastoquinone en l'occurence), mais évidemment aussi par leur vitesse de réoxydation : on conçoit ainsi que s'il existe une séquence d'accepteurs d'électrons du PS II moins sensible aux inhibiteurs de "type-DCMU", la phase α rendant compte de la réduction de Q soit en grande partie dépendante de la séquence Chl $\longrightarrow$ Q $\rightleftharpoons$ B $\rightleftharpoons$ A, tandis que la phase β ne serait imputable qu'à une séquence Chl Q $\rightleftharpoons$ A.

Enfin, il paraît nécessaire de répéter que le modèle proposé ici fait volontairement abstraction de l'influence du côté oxydant de PS II sur les rendements de fluorescence : la cinétique de la réaction inverse $Q^- \longrightarrow S_n$ affecte fortement la vitesse de réduction de Q (ETIENNE, 1974) ; de même, nous avons négligé l'influence possible de la DCMU (ou d'inhibiteurs du même type) sur le côté donneur du PS II, provenant d'une moindre durée de vie de S_2 (BOUGES-BOCQUET et al, 1973) ou d'une action du type agent ADRY (RENGER, 1973).

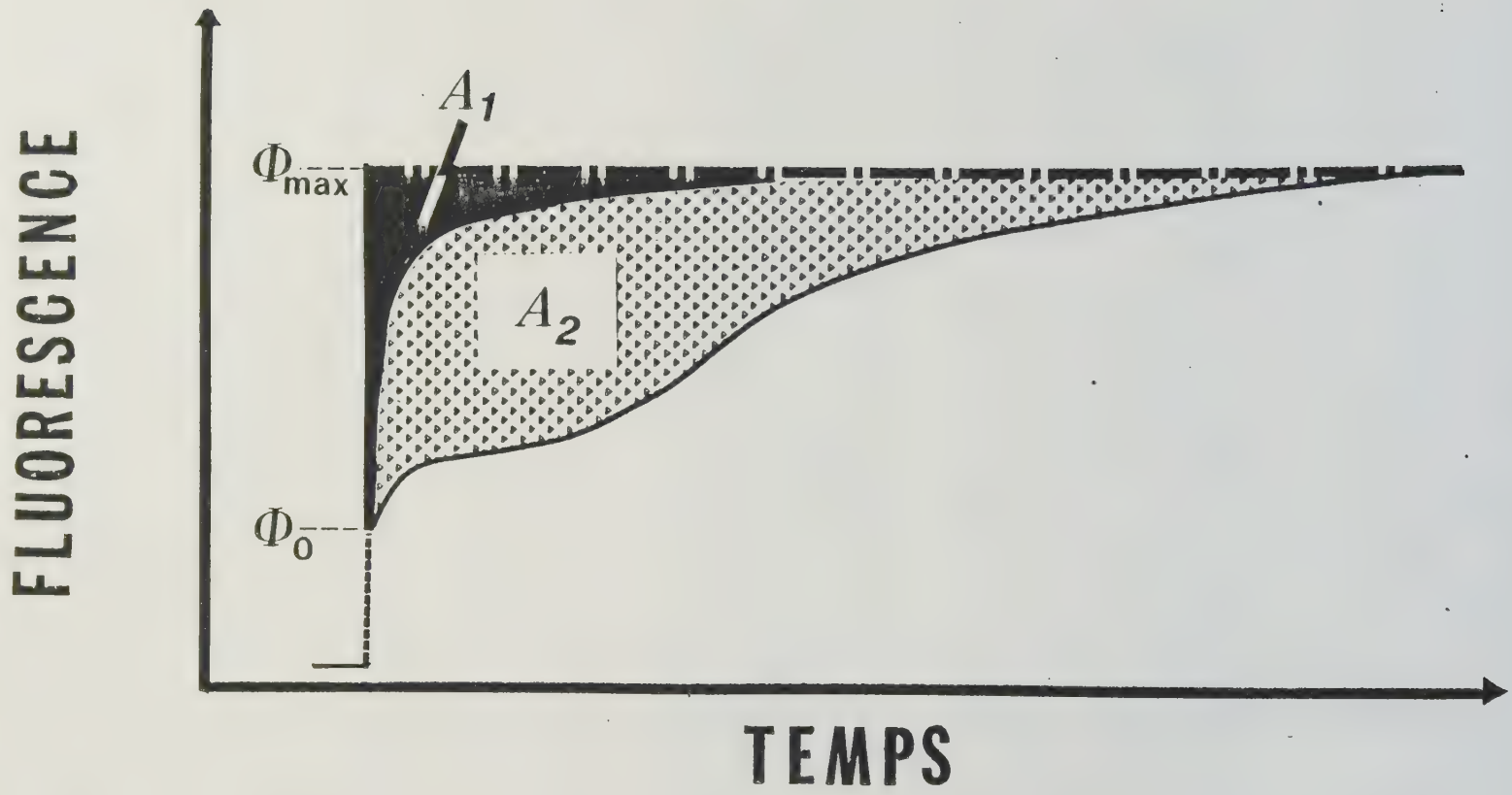


FIGURE 40 : Estimation des tailles d'aires de complémentarité A_1 et A_2 destinées au calcul du rapport des pools A/Q

A_1 : *aire de complémentarité au-dessus de la fluorescence variable, normalisée à ϕmax, obtenue en présence d'inhibiteurs de type-DCMU*

A_2 : *aire de complémentarité au-dessus de la fluorescence variable, normalisée à ϕmax, obtenue en l'absence d'inhibiteurs, soustraction faite de l'aire A_1*

3.4. - Essai de mesure de la taille relative des pools de Q et de A sur chloroplastes

Nous avons vu que les aires totales de complémentarité A_{max} représentaient une évaluation correcte de la taille du pool d'accepteurs du PS II en présence d'inhibiteurs de "type-DCMU". Toutefois, cette mesure ne donne qu'une proportion relative de pools . La difficulté réside donc dans la recherche d'une estimation de la concentration en Q par rapport à une unité connue. A cet égard, il est intéressant de prendre comme base le concept de l'unité photosynthétique concrétisé par le nombre de molécules de chlorophylles correspondant au dégagement d'une molécule d'O_2. Ce nombre a été estimé par différents auteurs à 2500 molécules (CHENIAE et MARTIN, 1968). Par ailleurs, depuis les travaux de KAUTSKY et al (1960), la notion de la présence d'une substance qui éteint la fluorescence de la chlorophylle, a été introduite. Cette substance appelée A_0 a été depuis dénommée Q selon la théorie désormais classique de DUYSENS et SWEERS. Le rapport entre le nombre de molécules de chlorophylle et de A_0 a été calculé comme étant voisin de 400/1, ce qui reste dans les limites de la taille de l'unité photosynthétique.
Cependant, le terme A a été attribué au pool de substances acceptrices d'électrons assurant la connexion entre les deux photosystèmes (JOLIOT, 1965). A est donc distinct de Q et le rapport entre ces 2 substances, abstraction faite de la possibilité de la présence de 2 accepteurs primaires Q_1 et Q_2 serait selon JOLIOT et JOLIOT (1972) :

$$Q = \frac{2}{2 + A^- / A}$$

Le rapport des tailles de pool de A sur celle du pool de Q de 18 à 1 a été proposé pour les chloroplastes d'épinards traités par la DCMU (FORBUSH et KOK, 1968), et de 14 à 1 avec des triazines : atrazine, cyanazine, procyazine (BREWER et al, 1979). Nous nous sommes proposés d'évaluer ce rapport en utilisant la méthode proposée par ZANKEL et KOK (1972), et qui consiste à mesurer la superficie des aires complémentaires au-dessus des courbes d'induction obtenues avec des préparations de chloroplastes témoin et traitées avec des inhibiteurs de "type-DCMU".

Le rapport pool A/pool Q est donné par la relation :

$$A/Q = \frac{A_2 - 0,5\ A_1}{0,5\ A_1}$$

A_1 et A_2 étant définis sur la figure 40.

Puisque la taille des A_{max} varie avec la concentration en inhibiteur, il est logique d'effectuer les mesures de A_1 et A_2 à diverses concentrations. A titre d'exemple, les valeurs des rapports A/Q correspondant à différentes concentrations de *Propanil* sont présentées ci-dessous :

Concentration finale	A/Q
$5.66.\ 10^{-7}$ M	0,038
$7.4.\ 10^{-7}$ M	0,51
$8.5.\ 10^{-7}$ M	1,05
$1.66.\ 10^{-6}$ M	3,86
$2.27.\ 10^{-6}$ M	7,5
$3.58.\ 10^{-6}$ M	9,15
10^{-4} M	12,3

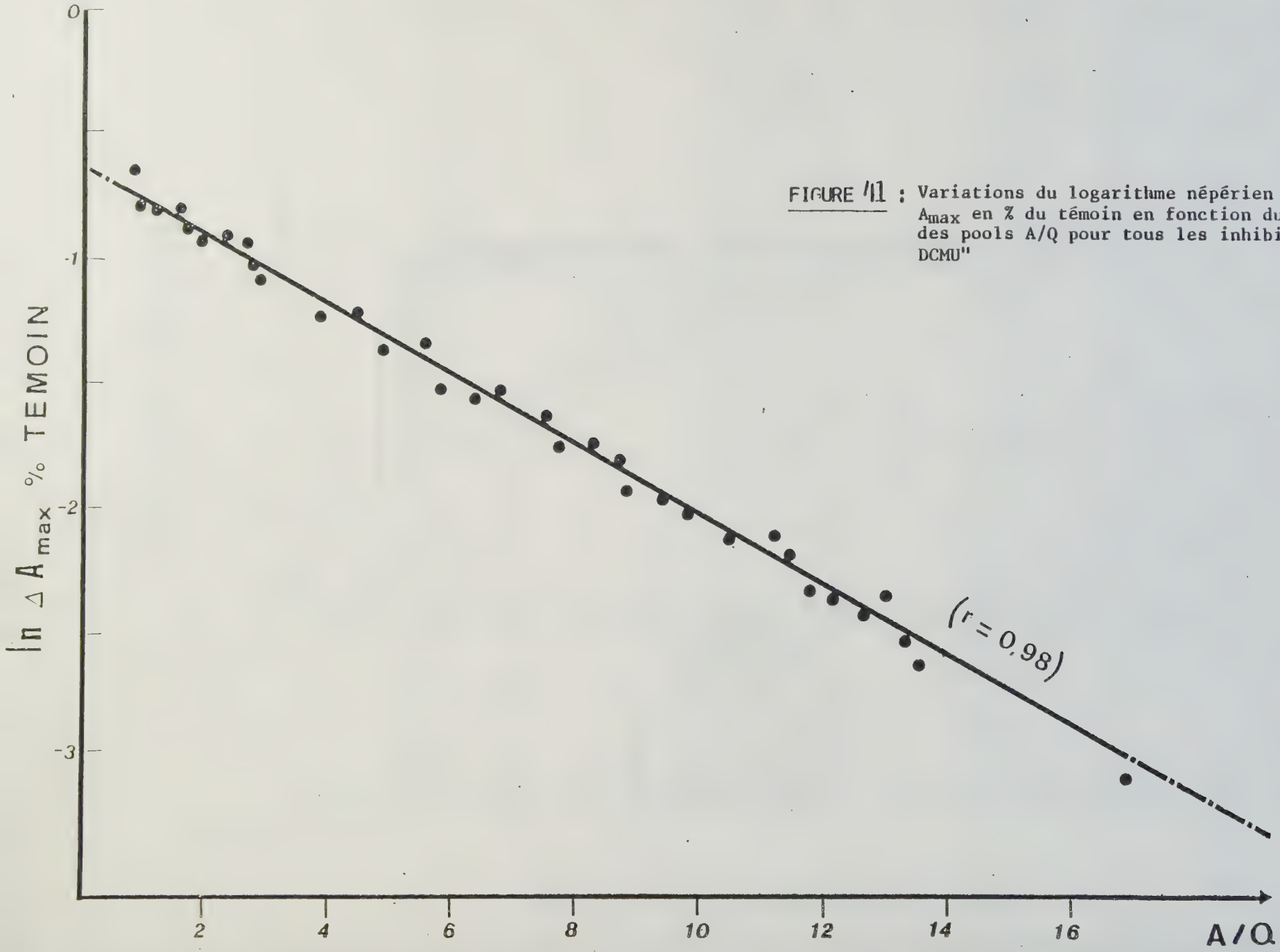


FIGURE 11 : Variations du logarithme népérien de l'aire totale A_{max} en % du témoin en fonction du rapport de taille des pools A/Q pour tous les inhibiteurs de "type-DCMU"

Il apparaît clairement que le rapport A/Q varie en fonction de la concentration en inhibiteur ; la valeur de 18 à 1 n'est toutefois pas atteinte ; en effet, en mesurant ce rapport obtenu à la concentration la plus élevée avec les divers inhibiteurs de "type-DCMU", on obtient :

Produit	Concentration finale	A/Q
DCMU	10^{-4}	16,5
LENACILE	10^{-4}	15
PROPANIL	10^{-4}	12,3
ATRAZINE	10^{-4}	13,2
IOXYNIL	10^{-4}	11,7
PYRAMINE	10^{-4}	8,4
RU 21731	10^{-4}	12,6
BARBANE	10^{-2}	21

Ces chiffres tendent à montrer que les tailles respectives du pool de Q et de A ne sont mesurables par l'évaluation des aires complémentaires que lorsque Q est totalement réduit, et non réoxydé par A, ce qui ne semble possible qu'en présence de très hautes concentrations en inhibiteurs ; de plus, ces inhibiteurs doivent être les plus puissants possible, faute de quoi un produit relativement peu actif, tel que le Barbane, est capable de donner un rapport A/Q de 21 à une concentration finale de 10^{-2}M.

Devant la difficulté d'obtenir une relation entre la concentration en substances dont l'activité inhibitrice est variable, et le rapport des tailles de pools de A et de Q, nous avons comparé ces dernières valeurs aux variations de A_{max} pour tous les inhibiteurs de "type-DCMU". Il est frappant de noter que pour chaque représentant d'une famille chimique *(N-phénylurées, N-Phénylcarbamates, N-acyl-anilides, s-triazines, benzonitriles halogénés, uraciles, pyridazinones, 1,2,4-thiadiazoles)*, les points obtenus à partir de cette relation s'alignent sur une même droite lorsque la transformation en ln A_{max} est effectuée (figure 41). L'étude de cette droite permet de montrer que, dans le cas des chloroplastes utilisés pour ces essais, il est pratiquement impossible d'atteindre une valeur du rapport de A/Q = 18, puisque ce chiffre correspond à une A_{max} d'une taille égale à 3,5 % seulement de celle du témoin. Si l'on reprend les figures 32, 33 et 34, il apparaît que la relation entre les concentrations en inhibiteurs et les variations de A_{max} est assimilable à des familles de droites dont la pente est très faible. Par conséquent, les concentrations requises pour atteindre cette valeur excèdent souvent 10^{-4}M, sauf dans le cas de la DCMU.
Lorsque la taille de l'aire A_{max} est réduite de moitié, ce qui correspond, selon l'hypothèse que nous avons formulée, à une proportion Q/Q^- de 0,5, le rapport de A/Q devient voisin de 0,3.
Enfin, le fait que ce rapport de taille de pools de A et de Q soit toujours inférieur à 18 à une concentration finale de 10^{-4}M en inhibiteur de "type-DCMU" et qu'à 10^{-2}M (cas du Barbane) A/Q = 21, montre qu'il est illusoire de vouloir mesurer d'une façon univoque les proportions relatives de la taille de ces pools pour n'importe quel matériel chloroplastique. A fortiori, il est aisé d'imaginer qu'*in-situ* la situation puisse être complètement différente des conditions réalisées *in vitro*.

Par suite, il ne semble pas possible, par la méthode des mesures d'aires de complémentarité en présence et en l'absence d'inhibiteurs, de déterminer quantitativement le rapport relatif des concentrations de chlorophylle, de A et de Q, puisque dans le concept de l'unité photosynthétique, ce rapport tend vers une valeur inconnue lorsque la concentration en inhibiteur tend vers l'infini (voir la relation $[A/Q] = \ln \Delta A_{max}$).

4 - CONCLUSION

D'un point de vue qualitatif, nous avons montré qu'aussi bien chez les chlorelles qu'avec les chloroplastes isolés, les courbes d'induction de fluorescence de la chlorophylle mesurée en présence d'inhibiteurs de photosynthèse pouvaient se diviser en deux groupes :

. Inhibiteurs de "type-DCMU" :

N-phénylurées, N-phénylcarbamates, N-acylanilides, s-triazines, triazinones, uraciles, hydroxy-benzonitriles halogénés, pyridazinones et 1,2,4-thiadiazoles.

. Inhibiteurs possédant un site d'action différent de celui de la DCMU :

diphényléthers, phénoxypyridazines, dinitroanilines.

Sur un plan quantitatif, une bonne homogénéité de résultats est observée entre valeurs de demi-effet mesurée sur la réaction de HILL et certains paramètres déterminés à partir des courbes d'induction de fluorescence en lumière continue. Ces valeurs sont comparées dans le tableau 14 (page 140).

D'une manière générale, les éléments rassemblés dans ce tableau permettent d'estimer qu'une bonne corrélation entre l'inhibition de la réaction de HILL et les cinétiques de réduction de Q existe, en admettant l'hypothèse émise par KAUTSKY et al (1960) et DUYSENS et SWEERS (1963), telle qu'elle a été mentionnée dans l'introduction de ce chapitre. Par ailleurs, les diverses approches entreprises mettent l'accent sur les limites des méthodes mettant en jeu l'étude des cinétiques d'induction de fluorescence en lumière continue, ainsi qu'une certaine méconnaissance des facteurs liés à la variabilité du matériel photosynthétique utilisé, éléments souvent ignorés dans la littérature.

Chez les chlorelles, la corrélation entre l'inhibition de la réaction de HILL et l'évolution des aires de complémentarité A_{max} d'une part, les niveaux de fluorescence stationnaire ϕmax d'autre part, est satisfaisante, bien que dans le dernier cas, les valeurs observées semblent indiquer une sensibilité supérieure du phénomène aux inhibiteurs. (*Comparer dans le tableau 14 : p ϕmax_{50} et p $SA_{max}{}_{50}$*)

En ce qui concerne les variations des aires de complémentarité A_{max} en fonction de la concentration en inhibiteur, l'analyse de régression par les fonctions logistiques tend à montrer qu'il existe une concentration-seuil au-dessus de laquelle l'addition d'inhibiteur ne provoque pas un changement important de la taille de A_{max} ; cette observation, également valable pour les chloroplastes, suggère qu'un certain niveau de saturation des sites intervienne au-delà de cette concentration-seuil. Alternativement, cette concentration peut représenter un seuil au-dessus des réactions inverses (oxydation de Q) sont totalement bloquées.

Chez les chloroplastes de tabac, les valeurs de demi-effet obtenues aussi bien sur les mesures de fluorescence transitoire que sur les variations d'aires complémentaires A_{max} sont très proches des pI_{50} correspondant au blocage du dégagement d'O_2 en présence de ferricyanure de K, ce qui tend à montrer que, comme chez les chlorelles, les techniques employées offrent une bonne évaluation de la vitesse et du degré de réduction de Q, et que le blocage de la réaction par les inhibiteurs de cette réaction représente bien la puissance relative d'inhibition de la réoxydation de Q par PQ dans la mesure où l'on s'est assuré au préalable - par des études d'induction de fluorescence - de l'existence d'un site identique d'action.

PRODUIT		CHLOROPLASTES POIS	CHLORELLES			CHLOROPLASTES DE TABAC				
NOM	FAMILLE	Réaction de HILL (réduction du Fe III pI_{50})	p ϕmax_{50}	p $SA_{max_{50}}$	constante de vitesse $k_\alpha > k_\beta$	pI_{50} dégagement O_2 Fe III accepteur	p $\phi_{v_{50}}$	p $\Delta A_{max_{50}}$	constantes de vitesse $k_\alpha > k_\beta'$	A/Q à 10^{-5} M
D C M U	N-phénylurées	6,82	7,22	6,8	oui	6,78	6,62	6,7	oui	16,5
BARBANE	N-phénylcarbamate	4,00	5,62	4,00	"	4,05	4,48	5,2	"	7,2
PROPANIL	N-acylanilide	5,29	6,22	5,31	"	6,15	6,15	6,07	"	12,3
ATRAZINE	s-triazine	5,76	6,92	5,68	"	6,49	6,38	6,34	"	13,2
METRIBUZIN	triazinone	6,57	7,09	6,49	"	-	-	-	-	-
IOXYNIL	OH - benzonitrile halogéné	6,57	7,30	6,01	"	6,20	5,65	5,70	oui	11,7
LENACILE	Uracile	6,67	6,40	6,58	"	6,23	6,46	6,69	"	15
PYRAMINE	Pyridazinone	5,85	5,22	5,82	"	5,43	5,30	5,52	"	8,4
RU 21731	1,2,4 thiadiazole	5,55	6,53	5,45	"	6,30	6,26	6,2	"	12,6

Tableau 14 - Comparaison des concentrations de demi-effet sur divers paramètres mesurés à partir des courbes d'induction de fluorescence en présence des inhibiteurs de "type DCMU" et comparées à la réaction de Hill basale en présence de ferricyanure de K (algues et chloroplastes).

A cet égard, l'*Ioxynil* est peut-être l'exemple d'un inhibiteur présentant une dualité de sites d'actions, puisque les valeurs de demi-effet calculées à partir des courbes d'induction de fluorescence en lumière continue sont toujours inférieures à celles obtenues sur la réaction de HILL : d'autres approches plus fines et surtout plus spécifiques sont nécessaires pour répondre à cette question.

Les techniques exposées dans ce chapitre reflètent en particulier l'état d'oxydro-réaction de Q, ce dernier étant contrôlé par d'autres éléments de la chaîne de transport d'électrons photosynthétique. En fait, nous savons que la DCMU produit un changement de potentiel redox de l'accepteur d'électrons B (ou R) vers une valeur plus électronégative. En raisonnant par analogie, on peut s'attendre à ce que les inhibiteurs du même type agissent de façon identique, ce qui n'a pu être prouvé dans ce chapitre : nous rechercherons d'autres tests plus spécifiques de la réaction $QB \rightleftharpoons Q^{-}B$ obtenue en présence de DCMU et des autres molécules semblant posséder une action similaire, méthodes qui seront exposées dans les chapitres suivants.

A partir d'études théoriques mettant en oeuvre la mécanique quantique, nous avons proposé une modélisation du côté réducteur du PS II, en déterminant les orbitales moléculaires de la PQ sous divers états de réduction. L'inconvénient de ce modèle est qu'il requiert de connaître la géométrie la plus probable des molécules étudiées dans leur état fondamental et la distribution de leurs électrons sur les orbitales moléculaires : ces contraintes limitent l'étude aux PQ elles-mêmes et excluent la mise en évidence de complexes de transfert de charges possibles entre les donneurs, les accepteurs d'électrons en amont et en aval de pool d'accepteurs du PS II. La modélisation proposée apporte toutefois un support théorique à l'hypothèse de l'hétérogénéité du côté accepteur du PS II, l'étude des cinétiques de croissance des aires de complémentarité normalisées à la ϕmax et leur analyse mathématique tendant à montrer l'existence d'un système à 2 compartiments.

La tentative de mesure du rapport de la taille des pools de A et de Q par les surfaces des aires de complémentarité A_{max} a montré que ce rapport est dépendant de la concentration et de la puissance des inhibiteurs. De plus, la forme logarithmique de la relation reliant A_{max} à la concentration en inhibiteurs suggère que lorsque cette dernière tend théoriquement vers une valeur très élevée, la taille de A_{max} tendrait vers l'infini chez les chlorelles, ou vers 0 chez le chloroplaste. Donner une signification au rapport A/Q semble donc illusoire, tout au moins à partir de mesures de fluorescence. Ces observations, mettant en relief la notion de concentrations saturantes, suggèrent par extension qu'il est théoriquement possible de trouver un inhibiteur plus puissant que DCMU : ce point a été vérifié expérimentalement par la synthèse de dérivés *N-alkyl-uraciles* dont les I_{50} sur la réaction de HILL avoisinent 10^{-8}M (PHILIPS, 1978).

REMARQUE

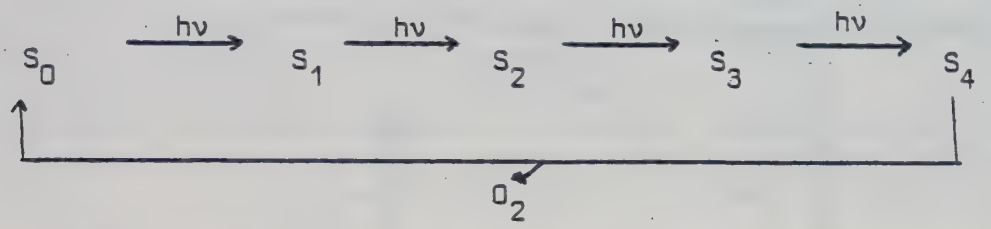
Il a été montré dans le paragraphe 3.1.2.1. de ce chapitre que la cinétique d'induction de fluorescence, en présence d'inhibiteurs, était sigmoïdale et qu'elle répondait à une loi log-normale dans sa totalité. L'analyse mathématique de cette cinétique réalisée dans le paragraphe 3.3.2. de ce chapitre en utilisant la transformation par la droite de Henry tend à montrer que la montée de fluorescence est biphasique et constituée d'une phase rapide α suivie d'une phase plus lente β. Cette dernière pourrait refléter la cinétique de séparation photochimique de charges au cours de la fin de montée de la fluorescence (DOSCHEK et KOK, 1972). Les mêmes auteurs mentionnent que la partie rapide de la montée peut varier d'une cinétique du 1er ordre à une cinétique du 4ème ordre, ce qui reflèterait une conversion à 1 ou 2 quanta.
L'analyse présentée ici suggère que les 2 phases décrites suivent 2 droites obéissant à 2 lois normales. Cette contradiction apparente provient du type de traitement mathématique employé : apparemment, l'utilisation de la forme réduite centrée de la loi normale permet une analyse plus fine du phénomène et suggère que la cinétique de fluorescence corresponde à une partie seulement de la fonction décrivant la forme intégrale de la loi normale, dont les bornes vont de $-\infty$ à $+\infty$ et non de ϕ_0 à ϕ max.

CHAPITRE II

MESURE DU NIVEAU INITIAL DE FLUORESCENCE AVEC DES CHLOROPLASTES TRAITÉS À L'HYDROXYLAMINE

1 - INTRODUCTION

L'état d'oxydo-réduction du donneur primaire d'électrons au PS II contrôle la fluorescence variable de la $Chl_{a}II$ (BUTLER, 1972), en plus de l'accepteur primaire Q. Deux systèmes supplémentaires modifient le rendement de fluorescence : du côté oxydant du PS II, le système d'accumulation de charges oxydantes, ou états "S" (JOLIOT et JOLIOT, 1972 , DELOSME, 1972, WOLLMAN et THOREZ, 1976).
Depuis les travaux d'ALLEN et FRANCK (1955) sur les études détaillées de l'évolution de O_2, des modèles cinétiques ont été proposés (P. JOLIOT et al, 1969, KOK et al, 1970) conduisant à la mise en évidence d'une accumulation de 4 charges requises pour l'évolution d'une molécule d'O_2 et schématisée ainsi :



Par ailleurs, DELOSME (1967) avait déjà mentionné la possibilité de l'existence d'un quencher non photochimique R, cinétiquement peu éloigné de l'oxydant A étudié par JOLIOT, et considéré comme un "second quencher"(DELOSME, 1972).

En utilisant la même technique d'études de fluorescence ou de dégagement d'O_2 en régime d'éclairs, BOUGES-BOCQUET (1973), VELTHUYS et AMESZ (1974) montrent que le PS II contient un complexe d'accepteurs QR, constitué d'un accepteur primaire Q et d'un accepteur secondaire R (ou B) capable d'accepter successivement 2 électrons et de les transférer par paire au pool A. Ces travaux prennent une importance particulière lorsque VELTHUYS et AMESZ (1974) montrent que DCMU produirait un glissement du potentiel redox de R vers une valeur plus négative, de sorte que la réoxydation de Q^- par R devienne très limitée.

Comme nous l'avons déjà mentionné, les inhibiteurs du "type-DCMU" augmentent le niveau de fluorescence initiale de la $Chl_{a}II$, comme cela avait été observé par JOLIOT (1964) et DELOSME (1967), avec la DCMU.
BENNOUN et LI (1973) montrent que DCMU induit une augmentation importante du niveau $\phi 0$ correspondant à l'inactivation d'une fraction des centres PS II en leur forme non-quencher, et ceci en présence de faibles concentrations en hydroxylamine. Le niveau de fluorescence initiale est par ailleurs modulé par le système d'accumulation de charges S, du côté donneur et par l'accepteur secondaire d'électron, B, du côté accepteur du PS II (WOLLMAN et THOREZ 1976). La propriété inhibitrice de l'hydroxylamine sur la photosynthèse découverte par SHIBATA et YAKUSHIJI (1933) est étudiée par divers auteurs et est finalement identifiée à une action sur les centres responsables de l'évolution de l'O_2 (BENNOUN et JOLIOT, 1969 - CHENIAE et MARTIN, 1970), en libérant une partie du Mn^{++} lié au système de photooxydation de l'eau (CHENIAE et MARTIN, 1970), et ceci à haute concentration. Lorsque des chloroplastes sont exposés à une forte illumination en présence d'hydroxylamine, non seulement la photooxydation de l'eau est inhibée, mais perd sa propriété d'oxyder des réducteurs exogènes (CHENIAE et MARTIN, 1970). Mettant à profit ces observations, ainsi que celles de BENNOUN et LI, WOLLMAN (1978) étudie sur algues l'état redox de B ou (R), montrant que si les rendements de fluorescence sont contrôlés par des états d'oxydation ou de réduction des constituants de l'ensemble ZQB (ou S_n QB), un pré-traitement à l'hydroxylamine suivi d'une illumination intense, change de façon irréversible l'état redox de l'accepteur secondaire, phénomène n'intervenant pas en l'absence d'hydroxylamine.

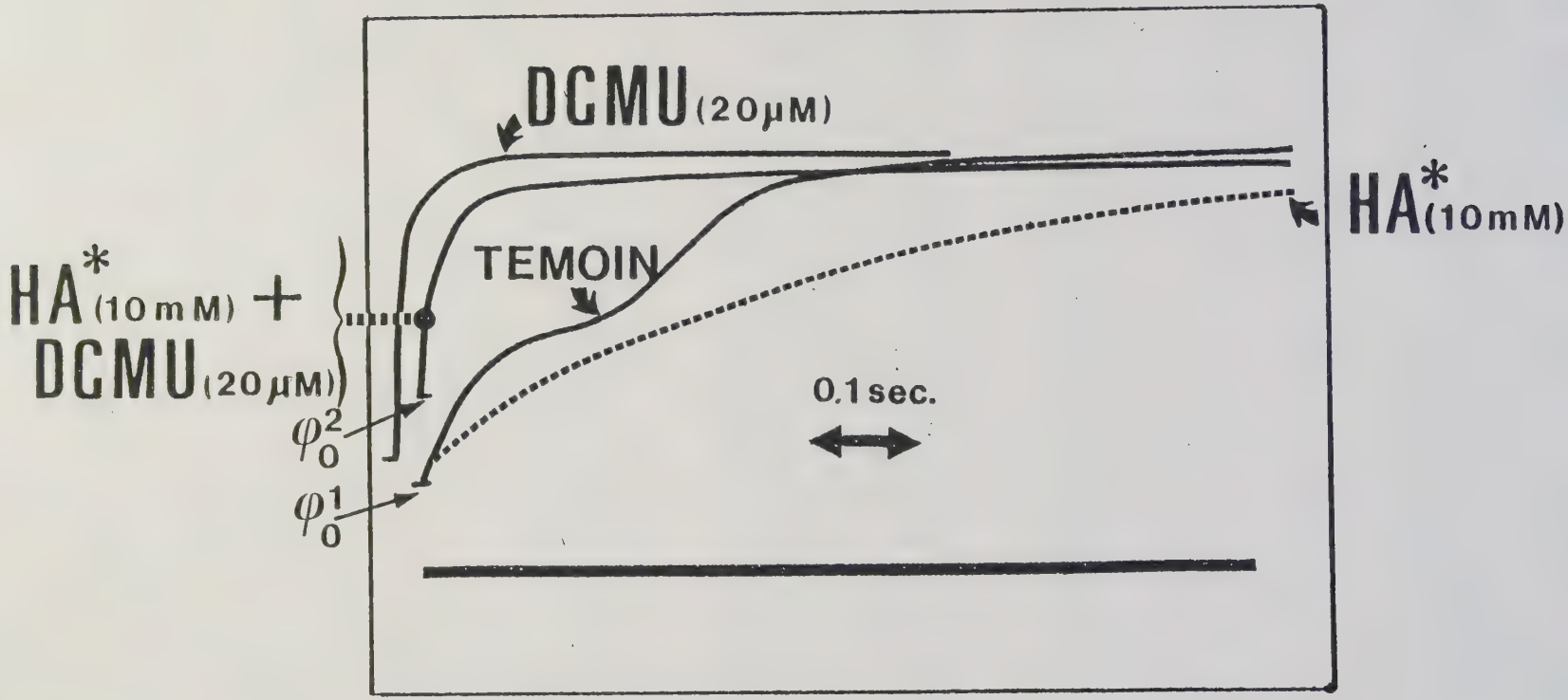


FIGURE 42 - Cinétiques d'induction de fluorescence de chloroplastes avec ou sans pré-traitement à l'hydroxylamine 10 mM et DCMU 20 µM. *(30 γ chlorophylle/ml - intensité d'excitation correspondante à un flux photonique de 85 µEinstein/m^{-2}/sec^{-1}).*

HA^* : pré-traitement à l'hydroxylamine et illumination par 5 éclairs actiniques.

L'addition de DCMU à des algues illuminées, en présence d'hydroxylamine, provoque un déplacement de l'équilibre $Q^-B \rightleftharpoons QB^-$ vers la droite, d'autant plus important que le côté donneur du PS II est inactivé. Nous utiliserons les propriétés décrites par WOLLMAN, pour essayer d'identifier l'action des divers inhibiteurs déjà testés à une transformation de QB^- en Q^-B.

2 - MATERIEL ET METHODES

Les chloroplastes sont extraits selon la technique décrite dans le §1.3 (Chap. II) et repris dans un milieu contenant du tampon Tris-HCl 0,05 M - pH 7,8 .

Les chloroplastes adaptés à l'obscurité sont incubés pendant 5 minutes en présence d'hydroxylamine 0,01 M, à l'obscurité.
Une première mesure du niveau ϕ_0 est effectuée (ϕ_o^1).
La même suspension est ensuite exposée à une série d'éclairs actiniques (en moyenne 5 éclairs d'un flash du commerce) puis laissée à l'obscurité durant 15 minutes. Les inhibiteurs sont ensuite ajoutés et le niveau initial de fluorescence ϕ_o^2 est mesuré.

3 - RESULTATS ET DISCUSSION

Lorsque les chloroplastes adaptés à l'obscurité sont traités par l'hydroxylamine HA, le niveau initial de fluorescence ϕ_o^1 reflète l'état redox des composants du système :

$$HA \text{ ---- } S_1 \text{ Chl } Q \text{ } B$$

Dans ces conditions, nous n'observons pas de changement de ϕ_o, mais la cinétique d'induction est différente du témoin: son amplitude est plus faible et la ϕ max n'est pas atteinte dans l'intervalle de mesure choisie (Figure 42).
A titre de contrôle, DCMU à 10^{-5}M est ajoutée et les caractéristiques des cinétiques d'induction de fluorescence en présence de tel inhibiteur sont retrouvées (Figure 42). L'utilisation d'une vitesse rapide de balayage (2 msec/division d'écran) permet de mieux observer les niveaux de ϕ_o. Ainsi, lorsque le protocole expérimental décrit ci-dessus est suivi, on obtient :

. chloroplastes + hydroxylamine $\Longrightarrow$ S_1 --- (HA) ChlQB ---------▶ φ_0^1

↓ 5 minutes

. chloroplastes + hydroxylamine + éclairement $\Longrightarrow$ S --(HA)* QB^-

↓ 15 minutes

. chloroplastes + hydroxylamine + DCMU $\Longrightarrow$ S -- HA* Chl Q^-B ---▶ φ_0^2

En effet, le rôle de l'hydroxylamine étant double (destruction du système de photooxydation de l'eau et donation d'électrons), une certaine quantité de QB^- est formée et reste stable à l'obscurité, comme cela a été suggéré par ETIENNE et LAVOREL (1975) et WOLLMAN et THOREZ (1976). L'addition de DCMU inversant le potentiel redox de B^-, un transfert d'équivalents réducteurs se produit de B vers Q^- (non quencher), conduisant à l'apparition de Q^-B : la fluorescence initiale augmente, (WOLLMAN, 1978) comme cela est vérifié et présenté sur la Figure 42. La cinétique de montée de fluorescence reste très proche de celle obtenue avec DCMU seule.

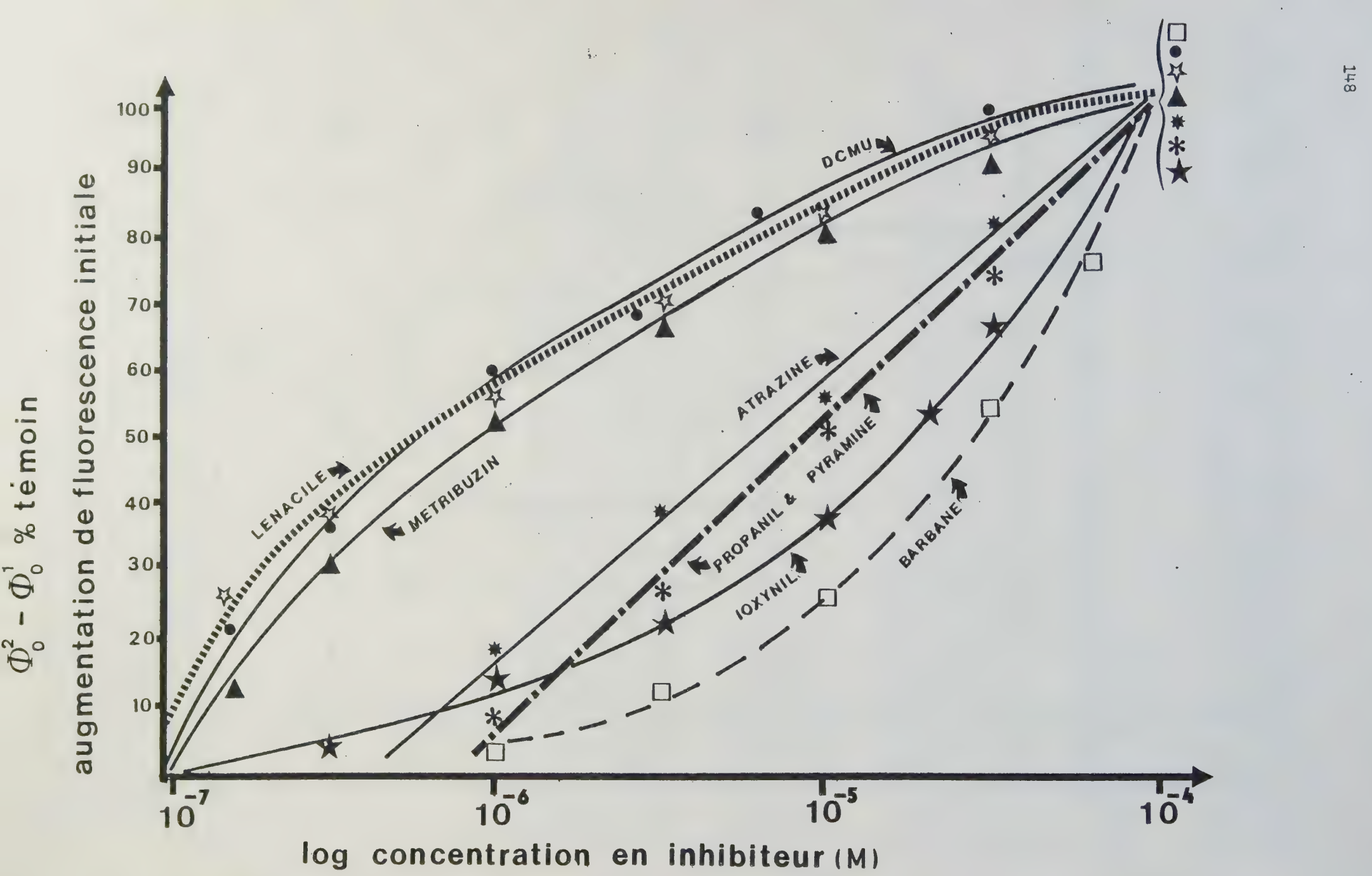


FIGURE 43 - Variations des niveaux de fluorescence initiale en fonction de la concentration en inhibiteurs de "type-DCMU", obtenues sur des chloroplastes de pois pré-traités à l'hydroxylamine.

L'addition de 10mM d'hydroxylamine ne modifie pas le niveau ϕ_o, mais l'amplitude de la montée de fluorescence est fortement diminuée, comme cela avait été observé par DELOSME (1967) : l'augmentation du niveau ϕ_o en présence de DCMU n'est donc imputable qu'à une action de l'inhibiteur sur l'accepteur secondaire B.

Par suite, nous sommes en présence d'une technique spécifique pour l'analyse d'une action éventuelle d'inhibiteurs de "type-DCMU" sur B^-. La recherche d'une relation quantitative entre concentration en inhibiteur et augmentation de ϕ_o devrait nous permettre de relier plus finement les valeurs d'inhibition obtenues par différentes techniques (sur la base des concentrations de demi-effet) à la proportion de B^- réduisant Q. Afin de mesurer avec une précision suffisante les variations de ϕ_o, la sensibilité de l'amplification de l'oscilloscope est augmentée, tandis qu'une vitesse rapide de balayage est choisie (1 msec/division), de sorte que l'induction de fluorescence soit négligée. En faisant varier la concentration en inhibiteurs, on obtient une série de valeurs arbitraires de $\phi_o{}^2$, qui sont comparées à celles obtenues avant pré-traitement ($\phi_o{}^1$). La différence $\phi_o{}^2 - \phi_o{}^1$ est convertie en pourcentages, le 100 % correspondant à la valeur maximale de ϕ_o obtenue avec une concentration saturante en inhibiteur. Les pourcentages obtenus sont portés sur un graphique (Fig. 43) pour les divers inhibiteurs, à des concentrations finales comprises entre 10^{-7} et 10^{-4}M, à partir desquelles la concentration produisant 50 % de stimulation de ϕ_o est déterminée ($S_{\phi_o 50}$).

Les cologarithmes des concentrations produisant une augmentation de 50 % de $\phi_o{}^2$ pour les différents inhibiteurs sont présentés dans le Tableau comparés aux pI_{50} obtenues sur la réaction de Hill, ainsi qu'aux p SA_{50} (aires complémentaires) présentées précédemment (Chapitre II-2ème partie). L'analyse des résultats de ce tableau suggère les conclusions suivantes :

- Tous les inhibiteurs classés jusqu'ici comme étant de "type-DCMU" provoquent une augmentation importante de ϕ_o, sauf le thiadiazole RU 21731. Le nitrofène et la trifluraline, précédemment classés dans une catégorie différente, ne produisent pas d'augmentation du niveau de ϕ_o. En d'autres termes, les N-phénylcarbamates, les acylanilides, les s-triazines, les uraciles, les hydroxybenzonitriles halogénés, les pyridazinones et les triazinones peuvent être considérés comme abaissant le potentiel redox de B vers une valeur plus basse, interdisant la réoxydation rapide de Q.

- La comparaison entre pI_{50} , $pS\phi_{o50}$ et pSA_{50} montre que les valeurs obtenues sur la stimulation de ϕ_o sont plus faibles que celles observées dans la mesure de l'inhibition de la réaction de Hill ou sur l'accroissement de l'aire complémentaire normalisée A_{max} dans une proportion variant de 2 à 5 selon les molécules, *exception faite de l'ioxynil et de RU 21731.* Plusieurs hypothèses peuvent être formulées, pour tenter d'interpréter ces différences . Bien qu'il soit difficile *a priori*, de décider quelle méthode est la plus représentative des inhibitions observées, il est tentant de choisir la mesure de $\Delta\ \phi_o$ comme l'approche la plus spécifique de la mesure d'une intéraction avec la "cible" B. Dans nos conditions expérimentales (addition d'hydroxylamine et pré-illumination) 50 % B^- sont produits et restent stables à l'obscurité (WOLLMAN, 1978), par suite il est logique d'attendre une action sur $\Delta\ \phi_o$ d'une ampleur moindre que celle obtenue par une méthodologie moins "spécifique" (réaction de Hill, réduction de Q), sans qu'une relation quantitative soit toutefois possible. De plus, le problème se complique par le fait que l'on ne sait pas si une fraction de l'accepteur secondaire reste réduite (B^-) même en présence d'inhibiteur ; sur ce point, l'addition de DCMU provoque la réduction quantitative de Q non seulement par B^- (VELTHUYS et AMESZ,1979) mais aussi par B^{2-} (GODVINDJEE et al.). Par ailleurs, il peut y avoir deux types de centres qui sont bloqués par DCMU, l'un où Q et lié à B et

.. / ..

TABLEAU 15

Comparaison entre les cologarithmes des concentrations de demi-effet obtenues sur la réaction de Hill (pI_{50}), de la stimulation du niveau initial de fluorescence de chloroplastes prétraités à l'hydroxylamine ($p^S \phi_{o_{50}}$) et des aires complémentaires normalisées ($p\ SA_{50}$)

	pI_{50} Ferricyanure	$p\ S\ \phi_{@,50}$	$p\ SA_{50}$
DCMU	6,82	6,10	6,8
Barbane	4,00	3,31	4,00
Propanil	5,29	5,04	5,31
Atrazine	5,76	5,12	5,68
Ioxynil	6,57	4,45	6,01
Lenacile	6,67	6,10	6,58
Pyramine	5,85	5,09	5,82
Metribuzin	6,57	6,04	6,49
RU 21731	5,55	0	5,45
Nitrofène	4,25	0	-
Trifluraline	4,85	0	-

l'autre dans lequel le transfert d'électrons après Q "court-circuite" B. En faisant abstraction de ces considérations, faute de mieux connaître la contribution relative des hypothèses citées ci-dessus, on peut également estimer que les inhibiteurs de "type-DCMU" peuvent agir non seulement sur B, mais également du côté donneur du PS II, effet masqué dans nos conditions expérimentales par le pré-traitement à l'hydroxylamine ; cette hypothèse a déjà été proposée pour la DCMU (BENNOUN et LI, 1973 - RENGER, 1973).

- Cas de l'ioxynil et du RU 21731 : le thiadiazole étudié, RU 21731, ne produit aucune augmentation de ϕ_o ; par suite, il y a contradiction entre les mesures d'induction de fluorescence, reflétant l'état redox de Q, et celles de $\Delta \phi_o$. Cette observation suggère que RU 21731 pourrait agir d'une manière différente de DCMU et des inhibiteurs du même type, l'intéraction pouvant se situer plus sur Q que sur B ; ce point demande confirmation.
En ce qui concerne l'ioxynil, bien que l'on obtienne une augmentation de ϕ_o très substantielle en présence de cet inhibiteur, la dose de demi-effet ($pI\ S\ \phi_{o50} = 4.45$) s'éloigne très fortement de la pI_{50} (6.57) ou de la $p\ SA_{50}$ (6.01), dans un rapport de l'ordre de 100. Ce résultat peut être interprété en envisageant la présence d'un site d'action principal (B^-) et d'un site d'action secondaire ; ce dernier pourrait être situé au niveau du système de photooxydation de l'eau, puisque une illumination des chloroplastes en présence d'hydroxylamine élimine l'activité du côté donneur tout en changeant de façon irréversible l'état redox des accepteurs secondaires, suggérant que la "sensibilité"moindre de B à l'ioxynil observée par la mesure de $\Delta \phi_o$ par rapport à d'autres méthodes (réaction de Hill, état redox de Q) serait attribuable à une dualité d'action du côtés accepteur et donneur de PS II.

o
o o

En observant les courbes présentées sur la Figure 43, il apparait que non seulement celles-ci ne semblent pas apparentées à des sigmoïdes, mais que leur forme varie en fonction de la "puissance" de l'inhibiteur. Une transformation log-probit montre qu'aucune de ces courbes ne s'adapte à cette distribution. Par contre, leur analyse mathématique conduit à mettre en évidence que toutes les courbes s'ajustent à des fonctions exponentielles de la forme $F(x) = 1 - e^{\alpha x - \beta}$, les droites correspondantes étant obtenues par la transformation $\ln[1-F(x)] = \alpha x + \beta$, à partir de laquelle une analyse de régression linéaire est possible.

La représentation graphique des droites obtenues est présentée sur la Figure 44 dans laquelle seul figure un représentant de chaque groupe de courbes, c'est-à-dire :

- Groupe 1 ... DCMU, Lenacile, Metribuzin
- Groupe 2 ... Atrazine, Propanil, Pyramine
- Groupe 3 ... Ioxynil, Barbane

Les droites obtenues dans chaque groupe ne sont pas exactement superposables mais possèdent la même allure. L'analyse de régression linéaire pour une transformation de la forme $\ln[1-F_{(x)}] = -\alpha x + \beta$ permet de dégager les conclusions suivantes :

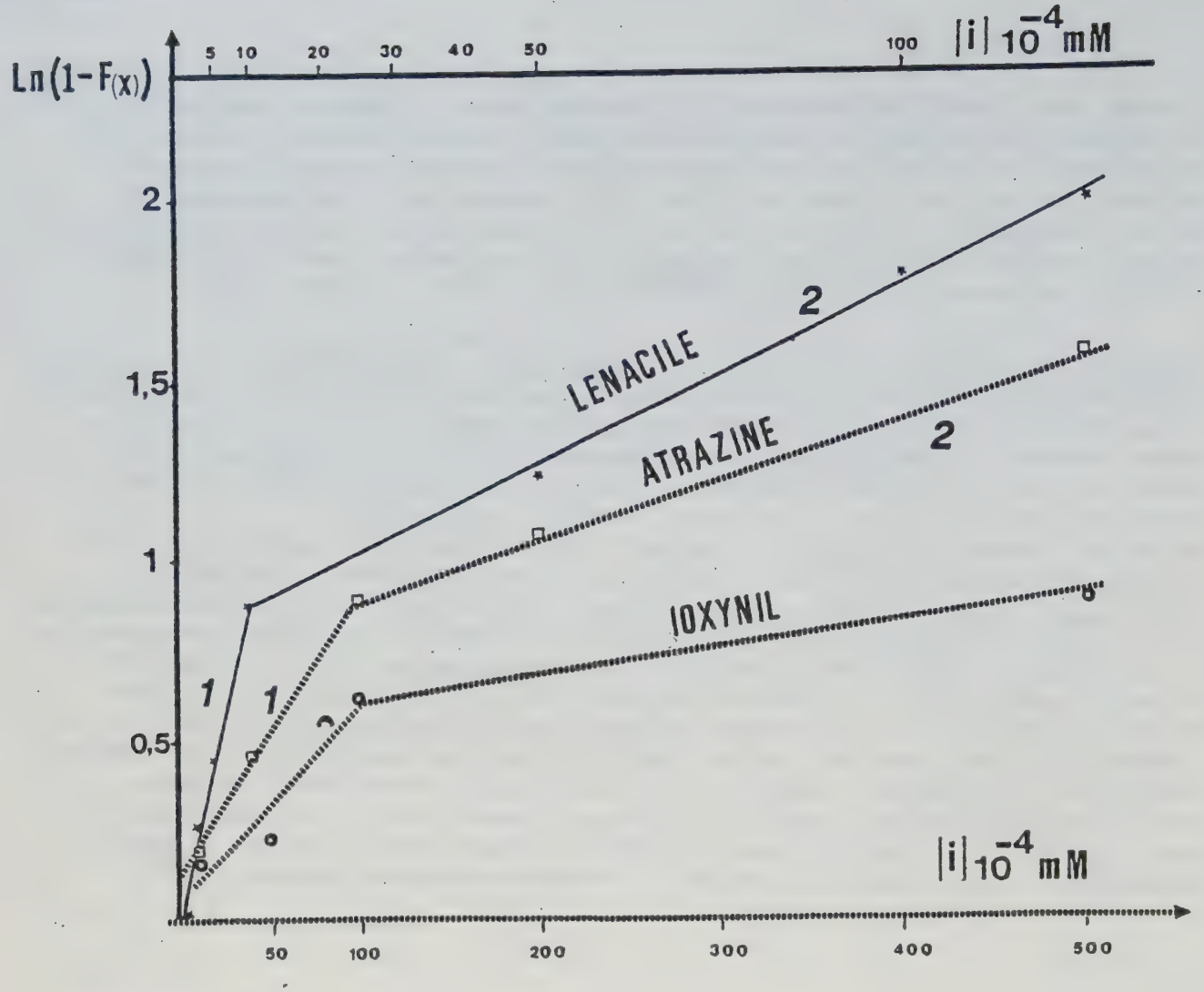


FIGURE 44 - Transformation de courbes choisies dans la figure 43, en droite par utilisation de la fonction $\ln [1-F_{(x)}] = \alpha x + \beta$

		Droites de régression	
LENACILE	Totale ...	$\ln [1-F_{(x)}] = -0,0069 x - 0,549$	(r = 0,96)
	droite 1..	" " $= -0,0031 x - 0,088$	(r = 0,98)
	droite 2..	" " $= -0,0060 x - 0,936$	(r = 0,99)
ATRAZINE	Totale ...	$\ln [1-F_{(x)}] = -0,0035 x - 0,217$	(r = 0,98)
	droite 1..	" " $= -0,0067 x - 0,119$	(r = 0,99)
	droite 2..	" " $= -0,0035 x - 0,218$	(r = 0,97)

- Groupe 1 : représenté par le LENACILE

L'ajustement à une seule exponentielle n'est pas pleinement satisfaisant (r = 0,95), mais une séparation en 2 exponentielles, illustrée par la cassure entre les 2 droites, fournit de bons coefficients de corrélation (par exemple : r = 0,986 et 0,995 respectivement pour les deux droites, dans le cas du LENACILE.

- Groupe 2 : représenté par l'ATRAZINE

Il est difficile de décider dans quelle mesure l'ajustement à une seule ou deux exponentielles est satisfaisant (r = 0,98 et 0,97 respectivement), malgré la cassure observée sur la figure 44.

- Groupe 3 : représenté par l'IOXYNIL

Dans ce cas, la transformation effectuée est du type "Logit" de la forme :

$$\text{Ln} \left(\frac{P}{1-p}\right) = \alpha x = \beta$$

L'observation visuelle de la figure 44 et l'examen des coefficients de corrélation (environ 0,91) montrent que nous ne sommes pas en présence d'une exponentielle, mais vraisemblablement d'une fonction plus complexe.

Une transformation sur papier log-1/log (figure 45) indique que la fonction est dans ce cas de la forme :

$$\log \Delta \phi_0 = \frac{1}{\log} \alpha \, (\text{Iox}) + \beta$$

Un aspect frappant des familles de courbes obtenues avec DCMU, Lénacile, Métribuzin, et dans une moindre mesure avec Atrazine, Propanil et Pyramine, est leur allure biphasique. De plus, le point de rupture entre les deux séries de droites se situe légèrement au-dessus de la concentration demi-effet ; cette observation avait été faite précédemment dans la relation établie entre concentration en inhibiteur et aires complémentaires de fluorescence normalisées. Il est difficile de trouver une signification physiologique à ce phénomène ; toutefois, on peut émettre l'hypothèse d'une accessibilité facile du site d'action lorsque l'inhibiteur est en petite quantité, puis cette accessibilité devient de plus en plus difficile lorsque la concentration augmente : il y aurait une valeur-seuil au-dessus de laquelle l'addition de quantités importantes d'inhibiteurs ne résulterait plus en un effet substantiel sur B. Ceci pourrait être dû à des positions variables des différentes molécules d'accepteur secondaire dans la membrane photosynthétique, ou à la présence d'une protéine couvrant Q (RENGER et al, 1976- RENGER, 1976) et vraisemblablement B, protéine pour laquelle les inhibiteurs auraient une certaine affinité ; par ailleurs, il est possible que B soit constitué par l'association d'une plastoquinone avec une protéine (PULLES et al, 1976 - DINER, 1975), ce qui expliquerait que le nombre de sites de liaisons soit progressivement saturé, en fonction de leur accessibilité ou de leur affinité pour les inhibiteurs ou qu'une certaine hétérogénéité ait pour conséquence la présence de 2 sites d'accessibilité différente.
En conclusion, nous pouvons admettre qu'il existe une bonne corrélation entre la "puissance" de l'inhibiteur et l'augmentation du niveau de ϕ_0 dans les chloroplastes pré-illuminés en présence d'hydroxylamine, sauf dans le cas de l'ioxynil où une dualité d'action semble apparaître et le thiadiazole (RU 21731) pour lequel aucune explication satisfaisante ne peut être fournie.

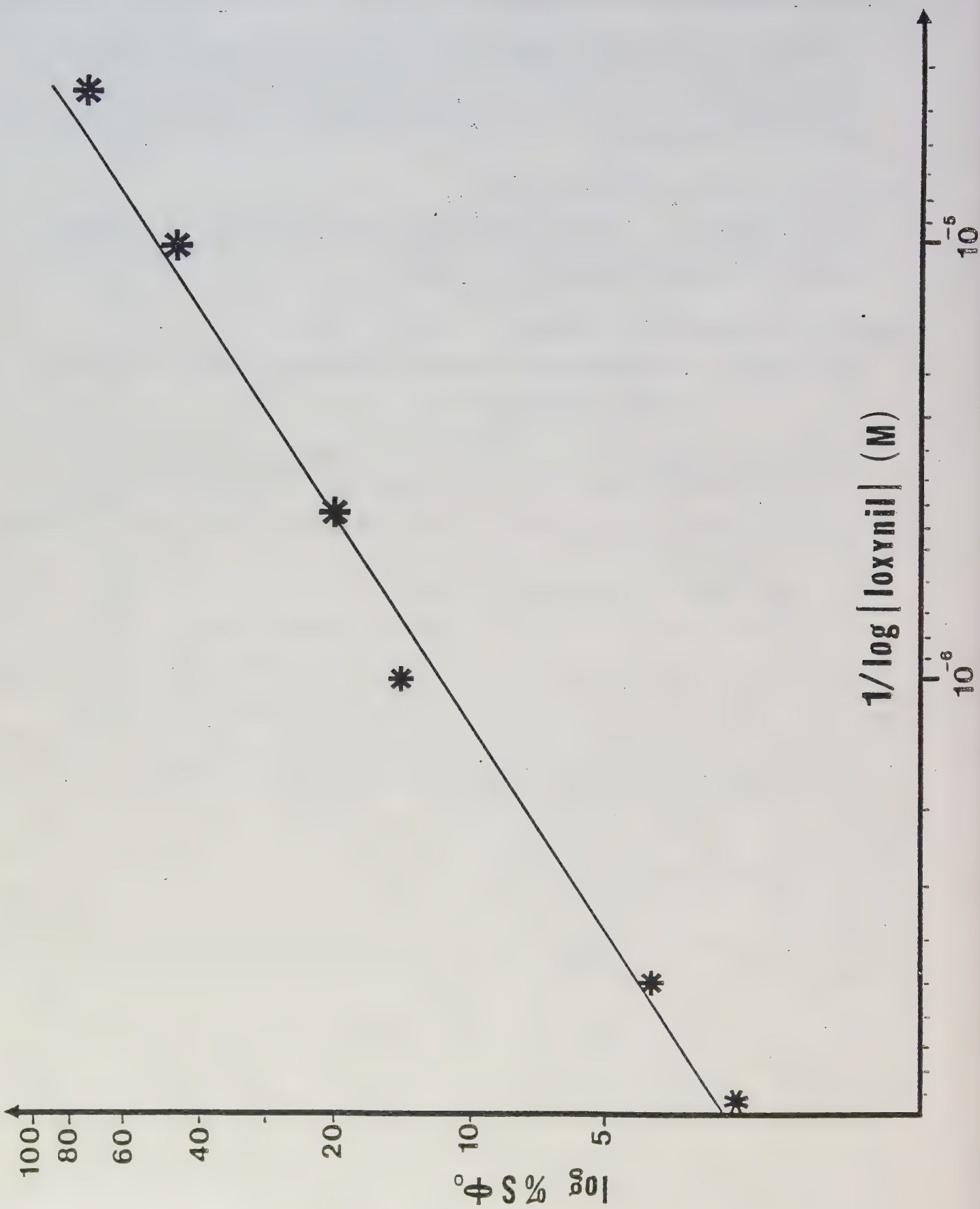


FIGURE 45 - Transformation en droite des variations du niveau de fluorescence initiale chez les chloroplastes prétraités à l'hydroxylamine, en fonction de la concentration en Ioxynil, par l'utilisation de l'équation $\log \Delta \phi_o = \frac{1}{\log} \alpha\ (Iox) + \beta$

CHAPITRE III

DECLENCHEMENT DE LUMINESCENCE PAR LES INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHESE CHEZ *CHLORELLA PYRENOIDOSA*

POSSIBILITE DE DUALITE D'EFFET DE L'IOXYNIL

1 - INTRODUCTION

Dans les organismes photosynthétiques, la luminescence est le résultat d'une désactivation radiative du premier état singulet de la chlorophylle a excitée(STREHLER et ARNOLD, 1951), dont l'origine est une réaction entre des produits photoxydés et photoréduits provenant des photoréactions (ARTHUR et STREHLER, 1957). En termes plus concrets, la conversion quantique dans l'appareil photosynthétique est la résultante du fonctionnement photochimique d'un système "vectoriel" qui utilise l'énergie lumineuse d'une molécule antenne de chlorophylle pour séparer une paire d'électron et de trou (LAVOREL, 1975). La luminescence observée chez les organismes photosynthétiques provient donc de la recombinaison spontanée d'une paire d'électron -trou des dipoles du PS II. Considérant que la luminescence est une expression directe d'une réaction inverse radiative du photoacte primaire (LAVOREL, 1968, 1971), les réactions qui en sont responsables peuvent se formuler ainsi (MALKIN, 1977):

$$PA \xrightarrow{h\nu} P\overset{*}{A} \longrightarrow P^+ A^- \quad \text{(excitation, séparation de charge)} \quad (1)$$

$$P^+ A^- \longrightarrow P\overset{*}{A} + h\nu \quad \text{(recombinaison, émission de lumière)} \quad (2)$$

dans lesquelles P est le donneur d'électrons (P_{680}) et A l'accepteur (Q)

Dans ce chapitre, nous ne nous préoccuperons que de la luminescence noire, à partir de matériel photosynthétique adapté à l'obscurité. Il est donc important de préciser que la luminescence noire n'est pas différente de la luminescence immédiate ou retardée : ce point a été montré par ETIENNE et LAVOREL (1975), en prétraitant les algues soit par chauffage, soit par l'hydroxylamine, traitement qui détruit ou déconnecte le système de photooxydation de l'eau (CHENIAE, 1970).

Toutefois, les expériences mentionnées ici ne constituent pas une duplication de celles réalisées sur la luminescence déclenchée physiquement ou chimiquement après pré-illumination du matériel photosynthétique. Un certain nombre de traitements sont connus pour déclencher une luminescence : transitions de pH, addition de sels, sauts de températures, application d'un champ électrique, transitions par acide-base et par oxydation ou réduction. Un traitement chimique approprié peut donc déclencher une luminescence par changement de l'état d'oxydation ou de réduction de l'un des substrats de la recombinaison évoquée plus haut. Reprenant l'hypothèse de VELTHUYS et AMESZ (1974), qui proposaient que DCMU change le potentiel redox de l'accepteur secondaire B, ETIENNE et LAVOREL (1975) montrent que DCMU appliquée à des algues adaptées à l'obscurité déclenchait une luminescence. Dans la mesure où une certaine quantité de B^- est présente et stable à l'obscurité (JOLIOT et JOLIOT, 1977 - WOLLMAN, 1978), la luminescence obtenue peut être exprimée d'une façon plus précise par la relation :

$$Z^+ \text{ Chl } Q\ B^- \xrightarrow{+\ DCMU} Z^+ \text{ Ch } Q^-\ B \longrightarrow Z \text{ Chl } Q\ B + h\nu \quad (3)$$

dans laquelle Z^+ est le donneur d'électrons au PS II. En fait, pour qu'il y ait recombinaison, une charge oxydante doit être présente du côté donneur du PS II, c'est-à-dire que Z^+ peut être formalisé par un état S de sorte que l'équation (3) devienne :

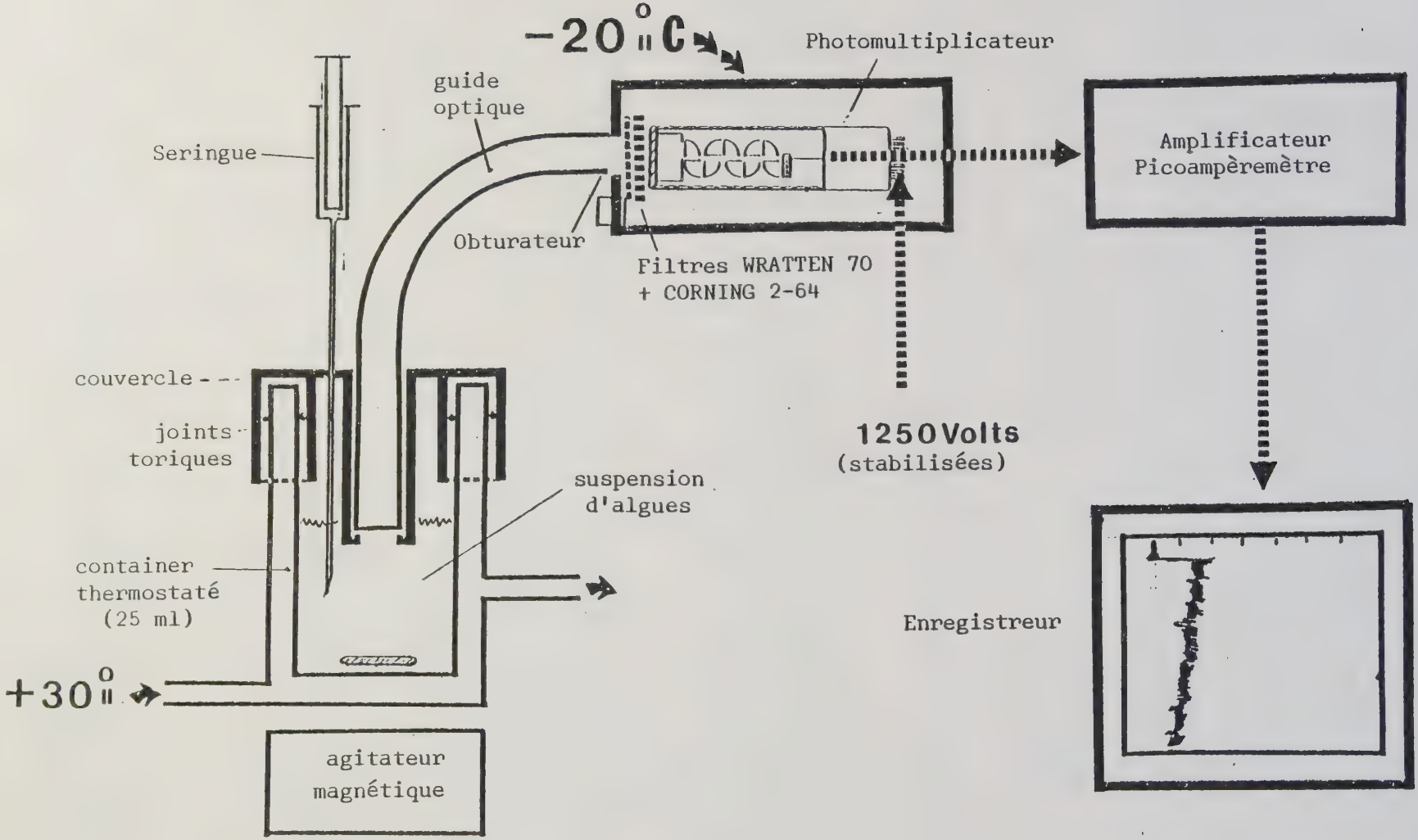


FIGURE 46 - Montage destiné à la mesure de la luminescence noire (d'après ETIENNE et LAVOREL, 1975)

$$S_n \text{ Chl } Q \ B^- + DCMU \longrightarrow S_n \text{ Chl } Q^- B \longrightarrow S_0 \text{ Chl } Q \ B + h\nu \quad (4)$$

Dans la mesure où l'état S_1 est également présent à l'obscurité, l'équation (4) s'écrit :

$$S_1 \text{ Chl } Q \ B^- + DCMU \longrightarrow S_1 \text{ Ch } Q^- B \longrightarrow S_0 \text{ Ch } Q \ B + h\nu \quad (5)$$

Il semble que S_1 puisse être remplacé par S_2 ou S_3 en tant que substrat de luminescence (LAVOREL, 1975).

La technique de mesure de luminescence déclenchée chimiquement semble donc présenter une méthode spécifique de l'intéraction chimique des inhibiteurs de type DCMU avec B^-.

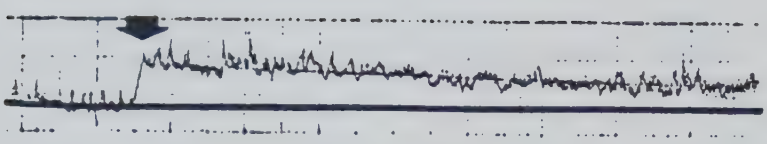
2 - MATERIEL ET METHODE

Les algues *Chlorella pyrenoidosa* sont cultivées tel que cela a été décrit dans le chapitre II. Elles sont prélevées et mises à adapter à l'obscurité sous agitation assurée par un barreau magnétique.

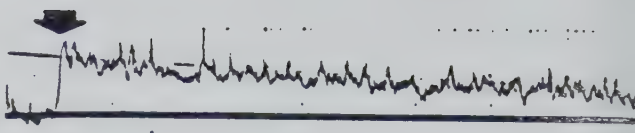
L'appareil de mesure de la luminescence est tel que décrit par ETIENNE et LAVOREL (1975) et schématisé sur la figure 46. Il est constitué essentiellement d'un récipient cylindrique à double paroi, surmonté d'un couvercle étanche à la lumière au milieu duquel un orifice est aménagé, permettant le passage d'un guide optique, dont une des extrémités est positionnée directement sur la suspension d'algues (volume utilisé : 25 ml), tandis que l'autre extrémité est placée devant des filtres rouges (WRATTEN 70, CORNING 2-64), situés devant la fenêtre d'un photomultiplicateur EMI 9558 B. Le photomultiplicateur est placé dans un boitier étanche et refroidi à -20°C. La tension appliquée au PM est de 1250 Volts, le courant anodique est amplifié par un pilcampèremètre LEMOUZY et le signal enregistré sur un enregistreur galvanométrique GRAPHISPOT.

La suspension d'algues (concentration équivalente à 70 γ de chlorophylle/ml) est prélevée au fur et à mesure des besoins et transférée dans le cylindre thermostaté à 30°C ; elles sont maintenues en suspension par agitation continue au moyen d'un barreau magnétique.

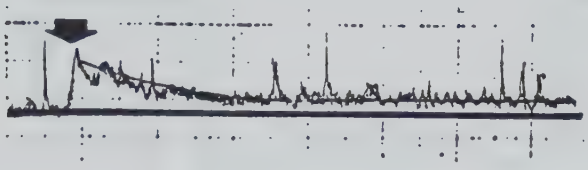
L'adaptation totale à l'obscurité du matériel photosynthétique est vérifiée par le retour du signal enregistré à la ligne de base. Les inhibiteurs solubilisés dans l'eau éthanolique à 1 %, sont ensuite injectés dans le cylindre réactionnel grâce à une seringue équipée d'une longue aiguille. Le signal obtenu est enregistré jusqu'au retour à la ligne de base.



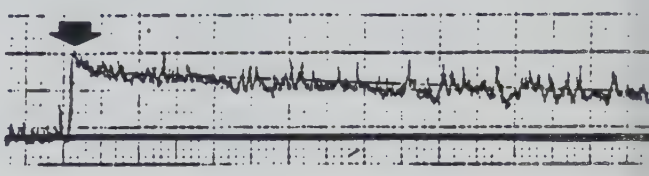
47a- *RU 12.259*



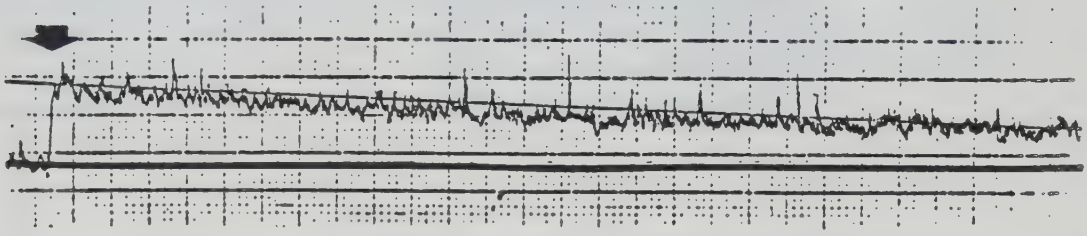
47a - *D C M U*



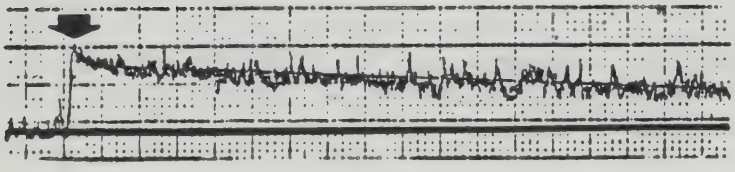
47a - *Propanil*



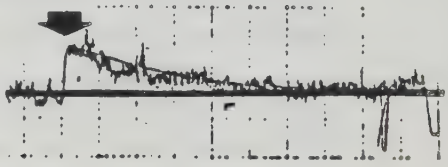
47a - *Lénacile*



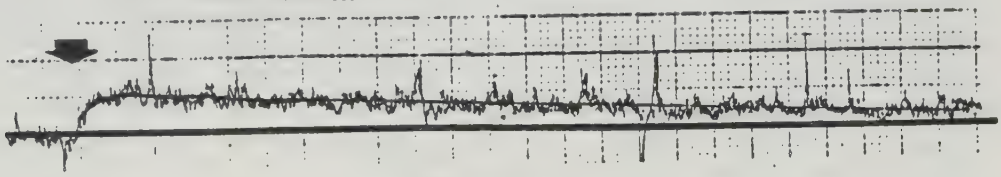
47a - *Atrazine*



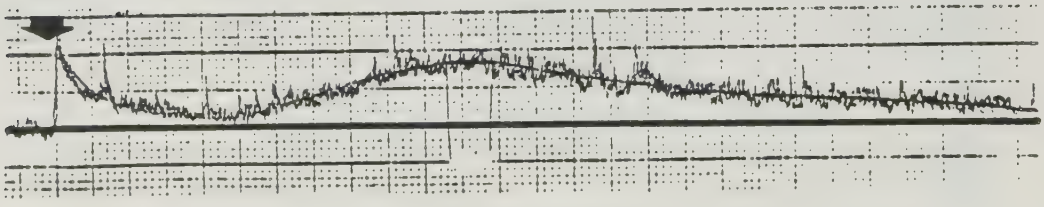
47a - Metribuzin



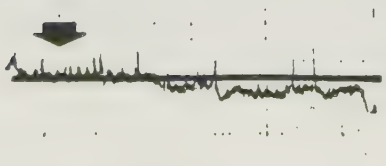
47a- *Barbane*



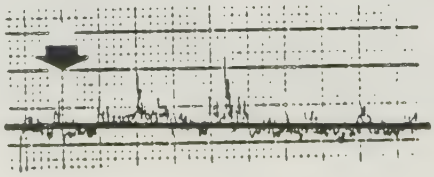
47a- *Pyramine*



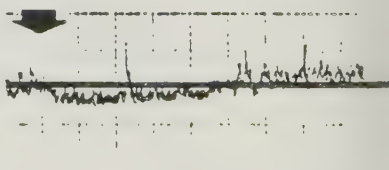
47b- *RU 21.731*



47c- *Nitrofène*



47c - *Ioxynil*



47c - *Trifluraline*

FIGURE 47 - Déclenchement de la luminescence par des inhibiteurs de photosynthèse sur chlorelles adaptées à l'obscurité (70 γ chlorophylle/ml, 10^{-10} Ampères par carreau, t=30°C). La flèche noire indique l'introduction des produits dans la chambre contenant les algues.

3 - Resultats et Discussions

3.1 - Effet qualitatif des inhibiteurs seuls

En injectant le plus rapidement possible les solutions éthanoliques d'inhibiteur, on obtient une montée immédiate de luminescence L_i, suivie d'une décroissance lente (de l'ordre de plusieurs minutes) jusqu'au retour à la valeur de la ligne de base.

La reproduction d'un enregistrement typique obtenu avec les inhibiteurs (10^{-4}M) est représentée sur la figure 41. On distingue 3 groupes de produits, selon la réponse obtenue en luminescence noire :

- DCMU, propanil, Atrazine, Lénacile, Pyramine, Métribuzin et barbane (figure 47-a) : l'allure générale des cinétiques de relaxation est identique bien que l'intensité de luminescence initiale et les t 1/2 de relaxation soient différents.

- RU 21731 : on observe un pic important de luminescence suivi d'une cinétique complexe de relaxation (figure 47-b)

- Ioxynil, Nitrofène et Trifluraline : aucune apparition de luminescence n'est observée en présence de ces inhibiteurs (figure 47-c)

En ce qui concerne les inhibiteurs du premier groupe, l'effet observé semble être en accord avec l'hypothèse de VELTHUYS et AMESZ, c'est-à-dire que, comme la DCMU, ils peuvent déplacer le potentiel redox de B vers une valeur plus négative, de sorte que Q soit réduit et qu'une recombinaison de charges s'opère, conduisant à l'émission de "luminescence noire". Dans une première approximation, nous apportons ici un support expérimental à l'idendité du site d'action des N-phénylcarbamates, N-acylanilides, s-triazines, triazinones, uraciles, pyridazinones ; à l'opposé, les dinitroanilines et les diphényléthers sont à éliminer du groupe des inhibiteurs du type-DCMU.

Dans le cas du thiadiazole RU 21731, le résultat obtenu est difficile à expliquer : les mesures d'augmentation de fluorescence initiale présentées dans le chapitre III montraient que cet inhibiteur ne produisait aucune augmentation de ϕ_0 quelle que soit la concentration utilisée ; dans les essais de luminescence noire, un niveau important de L_4 est obtenu mais la cinétique de relaxation présente une allure complexe. Un moyen simple de savoir dans quelle mesure RU 21731 interfère ou non avec le site d'action de DCMU, consiste à appliquer ce dernier inhibiteur après avoir déclenché la luminescence avec RU 21731. En effet, lorsque la luminescence noire a été obtenue par une concentration saturante en DCMU (par exemple 10^{-5}M), un deuxième traitement effectué avec DCMU après une totale relaxation des algues ne déclenche pas une nouvelle émission de luminescence (LAVOREL, communication personnelle). Nous avons donc appliqué RU 21731, puis DCMU à 10^{-5}M : aucune luminescence n'apparaît (figure 48-a).
Nous pouvons donc en déduire que, en ce qui concerne le site d'action du thiadiazole, l'identité entre DCMU et RU 21731 semble établie. Dans ces essais de double déclenchement, l'ordre des inhibiteurs ne doit pas avoir d'importance, dans la mesure où nous affirmons que DCMU = 21731. Malheureusement, en inversant cet ordre, c'est-à-dire en appliquant DCMU à 10^{-5} M, puis RU 21731 à 10^{-4} M après relaxation totale, nous obtenons un enregistrement ayant les caractéristiques suivantes (figure 48-b) :

.. / ..

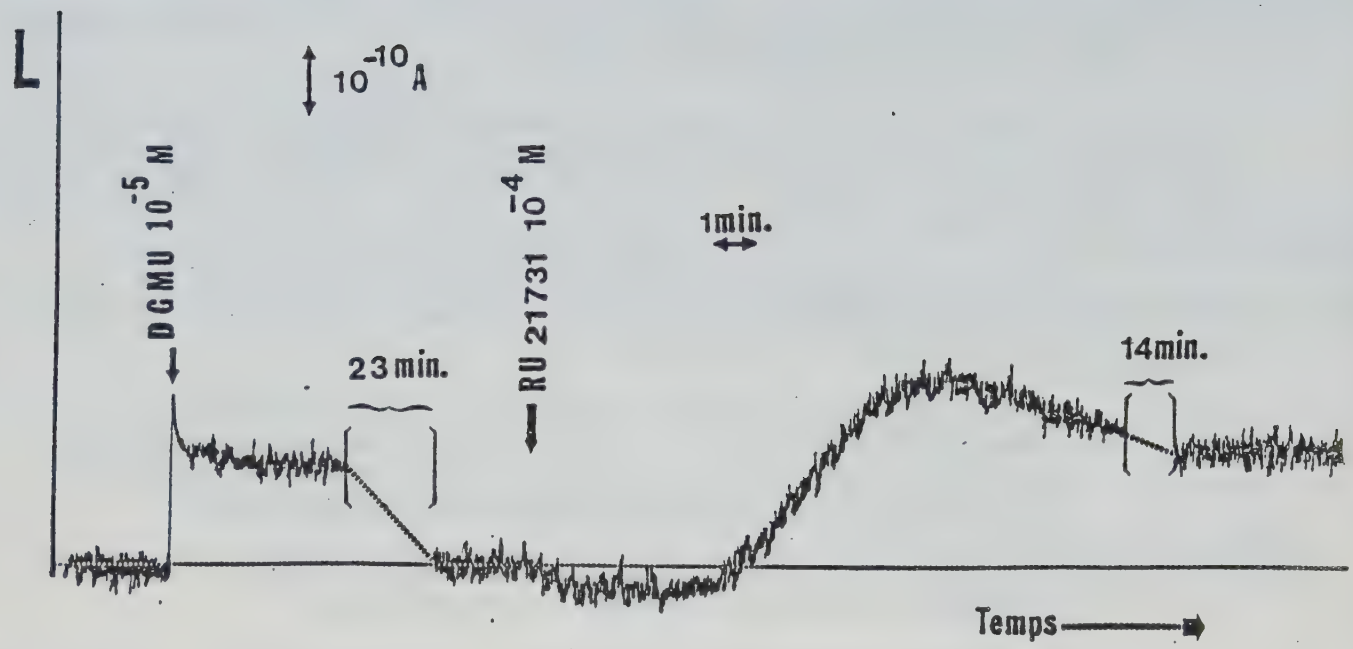


FIGURE 48 A. - Séquence d'addition d'inhibiteurs : DCMU ⟶ relaxation ⟶ RU 21731

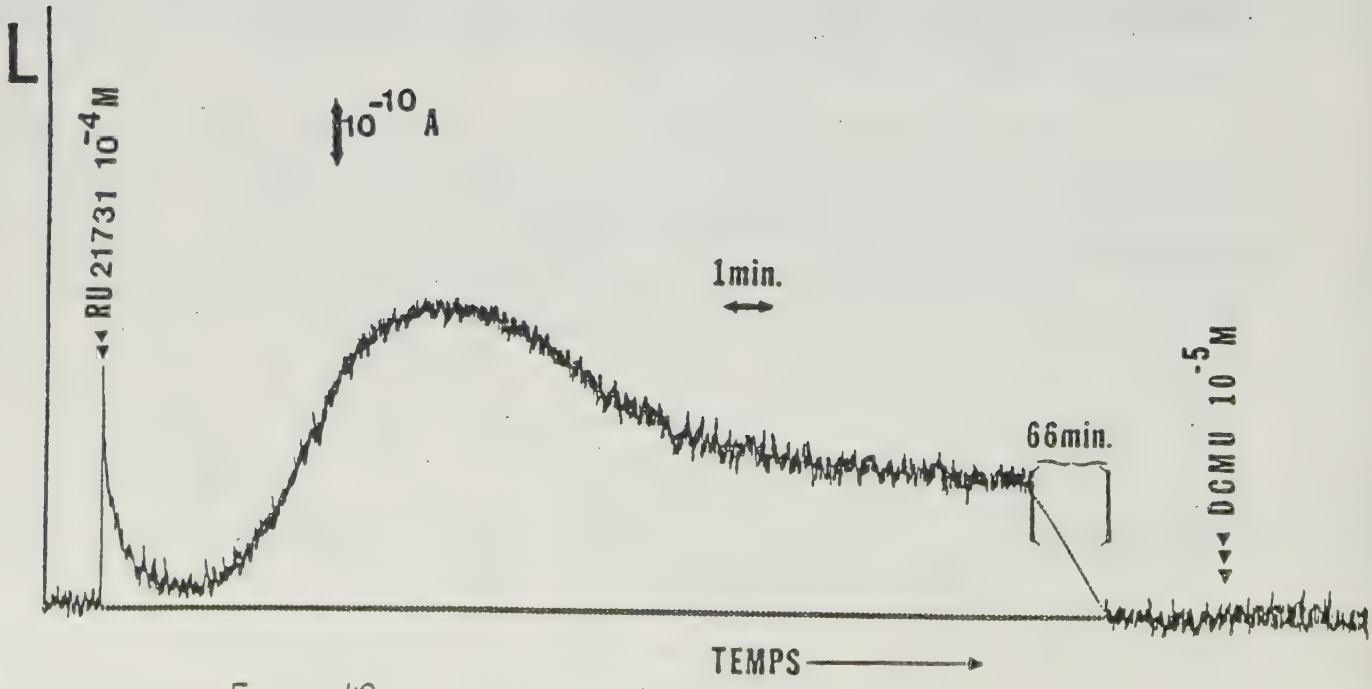


FIGURE 48 B. - Séquence d'addition des inhibiteurs : RU 21731 ⟶ relaxation ⟶ DCMU

FIGURE 48 - Essais de déclenchement de luminescence noire avec DCMU et RU 21731

- Le "pic" L_1 et la relaxation rapide observés avec RU 21731 seul sont abolis, tandis que la 2ème vague de montée lente subsiste.

- La relaxation se poursuit d'une façon similaire à celle observée avec RU 21731 seul, cependant un niveau constant de luminescence subsiste sans retour à la ligne de base.

Ces résultats sont difficiles à expliquer : sur la base des mesures d'induction de fluorescence de la Chl_{aII}, RU 21731 reste indubitablement un inhibiteur de type de DCMU ; toutefois, nous n'avons pas de preuve que cet inhibiteur agisse plutôt sur Q que sur B, puisqu'une luminescence noire est observée, et ceci lorsque le côté donneur du PS II est intact ; ce n'est pas le cas dans les essais décrits dans le chapitre III, où le système de photo-oxydation de l'eau a été détruit par NH_2OH. On pourrait en déduire qu'une intéraction directe existe entre RU 21731 et le centre S_n Chl_a Q B, par exemple au travers d'une interférence de nature inconnue avec un état S ; cependant aucune donnée sur l'acceptation ou la donation d'électron (s) ou de proton (s) des thiadiazoles n'est disponible ; des études plus approfondies seraient requises pour répondre à cette question.

3.2 - Déclenchement simple ou double de luminescence noire par H_2O_2 et les inhibiteurs

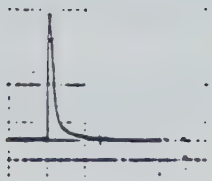
ETIENNE et LAVOREL (1975) ont montré que H_2O_2 seule pouvait déclencher une luminescence noire dont l'intégrale $\Sigma L = \int_0^\infty L dt$ était de 7 fois supérieure à celle obtenue avec la DCMU. Nous avons répété cet essai avec H_2O_2 à 0,3 % avec les inhibiteurs ; les enregistrements obtenus sont reproduits sur la figure 49. Il semble y avoir additivité des effets entre H_2O_2 et les N-phényl-urées, N-phénylcarbamates, N-acylanilides, s-triazines, triazinones, uraciles et thiadiazoles. L'ioxynil, le Nitrofène et la Trifluraline produisent une luminescence noire dont l'amplitude ne dépasse pas celle de H_2O_2 seule, ce qui corrobore ce qui avait été observé avec les inhibiteurs seuls. Un autre point également vérifié est l'émission d'un niveau constant de luminescence sans retour à la ligne de base. Cette particularité avait été notée par ETIENNE et LAVOREL, les auteurs invoquant la possibilité d'une activité pseudo-catalasique du PS II. Cette hypothèse prend tout son relief en considérant les travaux de VELTHUYS et KOK (1978) qui suggèrent que l'état S_1 (stable à l'obscurité) peut être réduit par une paire d'électrons provenant à l'obscurité de H_2O_2 et plaçant le système enzymatique d'évolution d'O_2 dans un état S_{-1} ; la compréhension du maintien d'un certain niveau de luminescence requiert la démonstration de l'existence d'un système régénérant en partie H_2O_2. En fait, durant la réaction de Mehler, la ferredoxine réduite peut réduire à son tour l'O_2 en une étape monovalente conduisant à la formation de radicaux anioniques superoxydes, $O_2^{\cdot -}$, selon le schéma :

$$PS\ I \longrightarrow Fd \xrightarrow[O_2]{1\ e^-} O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -}$$

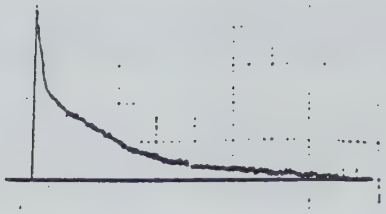
Ces radicaux peuvent se dismuter en présence de superoxyde dismutase (SOD) :

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

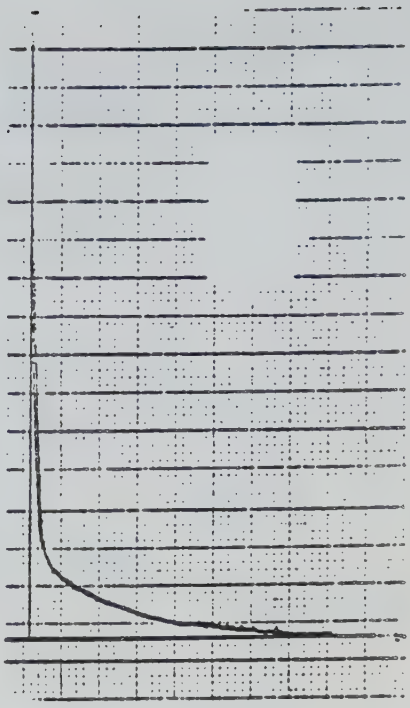
Cette formation de H_2O_2 résulterait non seulement de la dismutation d'un radical libre superoxyde, mais également de l'action d'un système appelé "oxygen Reducing factor" ou ORF (ELSTNER et al, 1975).



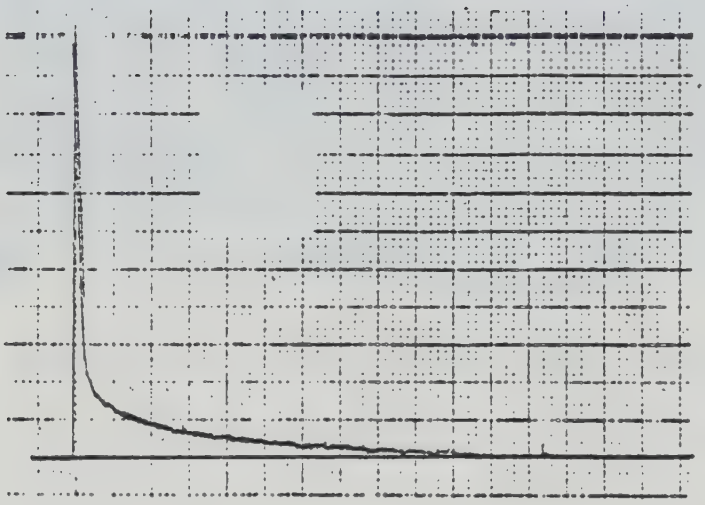
H_2O_2 + 0,3 %



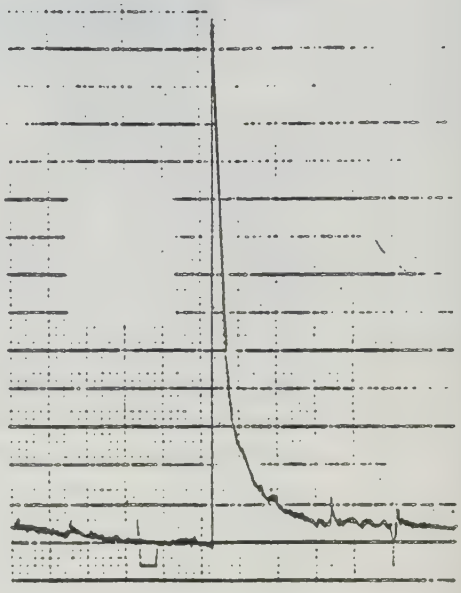
DCMU + H_2O_2



RU 21.731
+ H_2O_2

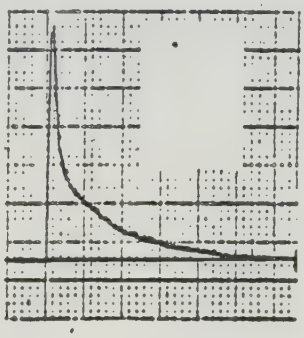


- Propanil + H_2O_2

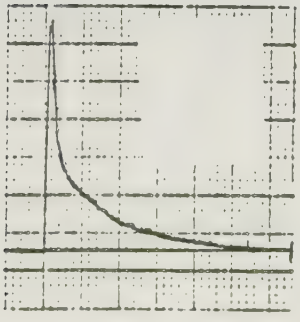


Crédazine + H_2O_2

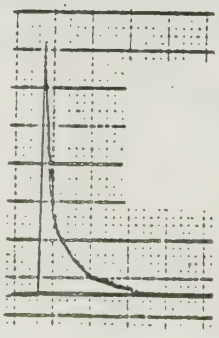
Pyramine + H_2O_2



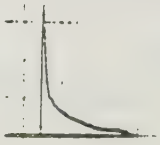
Métribuzin + H_2O_2



Atrazine
+ H_2O_2



Lénacile
+ H_2O_2



Nitrofène Ioxynil Trifluraline

+ H_2O_2

FIGURE 49 - Double déclenchement de la luminescence sur les chlorelles adaptées à l'obscurité, par addition de H_2O_2 (0,3 %) + un inhibiteur de photosynthèse.

Ces radicaux peuvent également se dismuter spontanément en oxygène singulet qui possède des électrons de spin appariés :

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow {}^1O_2 + O_2^{=}$$

Cette dernière forme est très réactive et peut oxyder un grand nombre de composés du métabolisme . Toutefois, dans le cas de la SOD, le problème de la compartimentation de ce facteur reste posé, puisque SOD semble être localisée principalement dans le stroma du chloroplaste (JACKSON et al - 1978). De plus, la réaction de Mehler se produit à la lumière, tandis que dans les essais mentionnés ici, les algues sont maintenues à l'obscurité.

3.3 - Relation quantitative entre la concentration en inhibiteurs et l'amplitude de la luminescence noire

Il est important de vérifier dans quelle mesure un "effet-dose" est obtenu avec les inhibiteurs de type "DCMU" sur la luminescence noire, ce qui devrait permettre de constituer une preuve supplémentaire de la spécificité de ce test en tant que mesure de la reversion du potentiel redox de B . Ce point a été vérifié par LAVOREL (communication personnelle) avec DCMU que ce soit en comparant l'intensité de la luminescence initiale L_i ou la vitesse décroissance de la lumière émise avec la concentration en inhibiteur : les valeurs de demi - effet sont parfaitement comparables avec celles obtenues sur une inhibition de photoreaction par une méthode classique. Nous avons fait varier la concentration en inhibiteurs et mesuré la luminescence initiale L ainsi que la somme de lumière émise ΣL par pesée des surfaces obtenues. Dans les deux cas, la forme de la relation dose-effet est sigmoïdale, dont la transformation en échelle log-probit conduit à des droites dont l'équation varie en fonction des inhibiteurs. Ces droites sont présentées dans les figures 50 et 51, (L), 52 et 53 , (ΣL). Les coefficients de corrélations oscillent entre 0,96 et 0,99. Les concentrations de demi-effets sont mesurés et rassemblés dans le tableau 16, en comparaison avec la pI_{50} obtenue sur le transport d'électrons en présence de ferricyanure ; la valeur de ΣL n'a pas été mesurée dans le cas du thiadiazole (RU 21731), compte tenu de l'allure complexe de l'évolution de la luminescence noire en fonction du temps. L'ordre de grandeur des pL_{i50} , $p\Sigma L_{50}$ et pI_{50} est le même, ce qui tend à montrer que les inhibiteurs de type "DCMU" produisent bien un changement du potentiel redox de B vers une valeur plus négative et que la mesure de la luminescence noire constitue un test spécifique de l'action de substances chimiques sur B. Il faut toutefois mentionner que dans nos essais, nous trouvons une variation de ΣL proportionnelle à la concentration en inhibiteur, alors que LAVOREL (1980) mentionne l'invariance de cette valeur représentant le produit L_D par le temps.

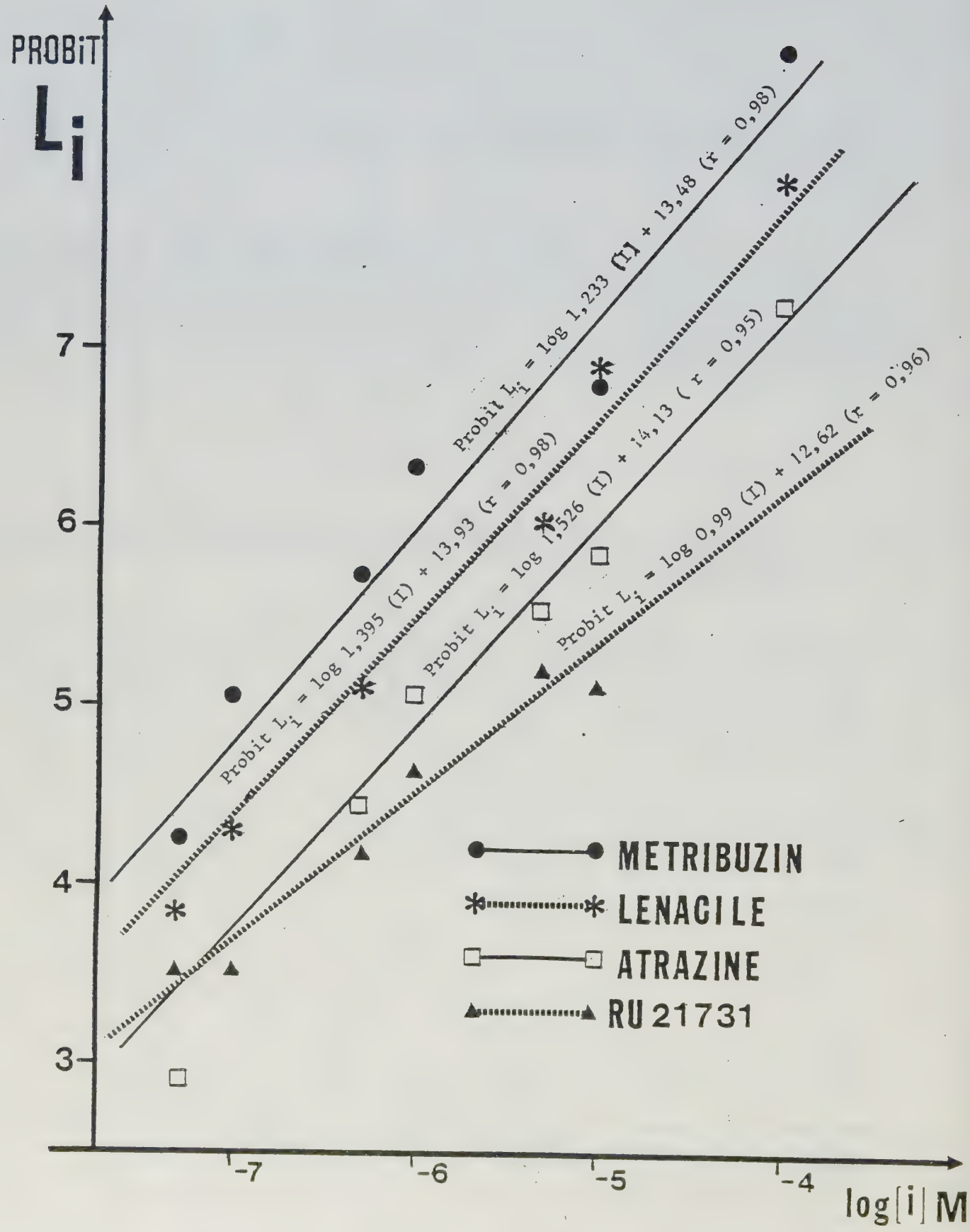


FIGURE 50 - Relation entre le log de la concentration en *Metribuzin, Lénacile, Atrazine et RU 21731,* et le probit de la luminescence initiale obtenue sur chlorelles adaptées à l'obscurité (70 γ chlorophylle/ml). *Les équations des droites correspondantes et les coefficients de corrélation sont indiqués sur la figure pour chaque inhibiteur.*

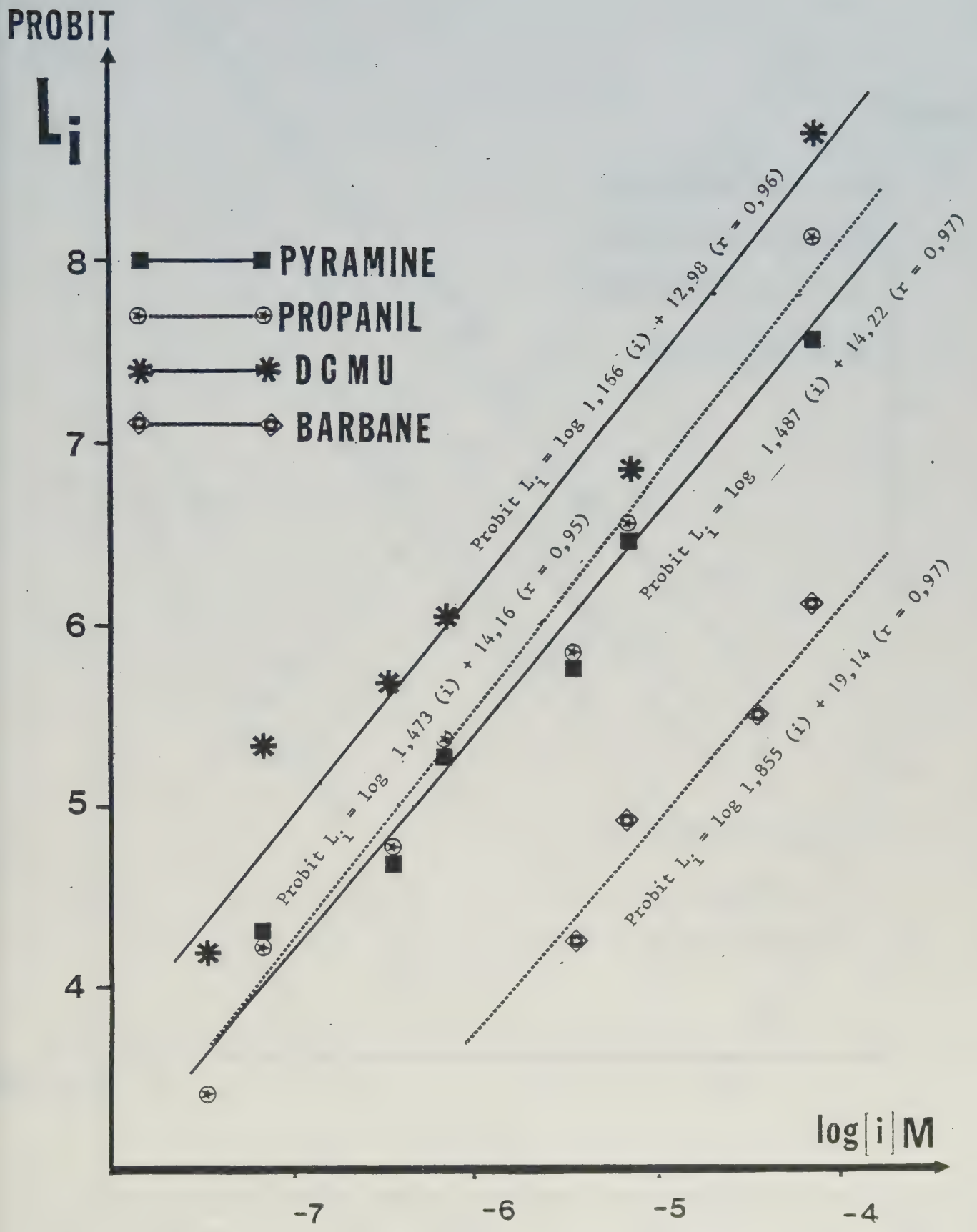


FIGURE 51 - Relation entre le log de la concentration en *Pyramine, Propanil, DCMU et Barbane,* et le probit de la luminescence initiale obtenue sur chlorelles adaptées à l'obscurité (70 γ chlorophylle/ml). *Les équations des droites correspondantes et les coefficients de corrélation sont indiqués sur la figure pour chaque inhibiteur.*

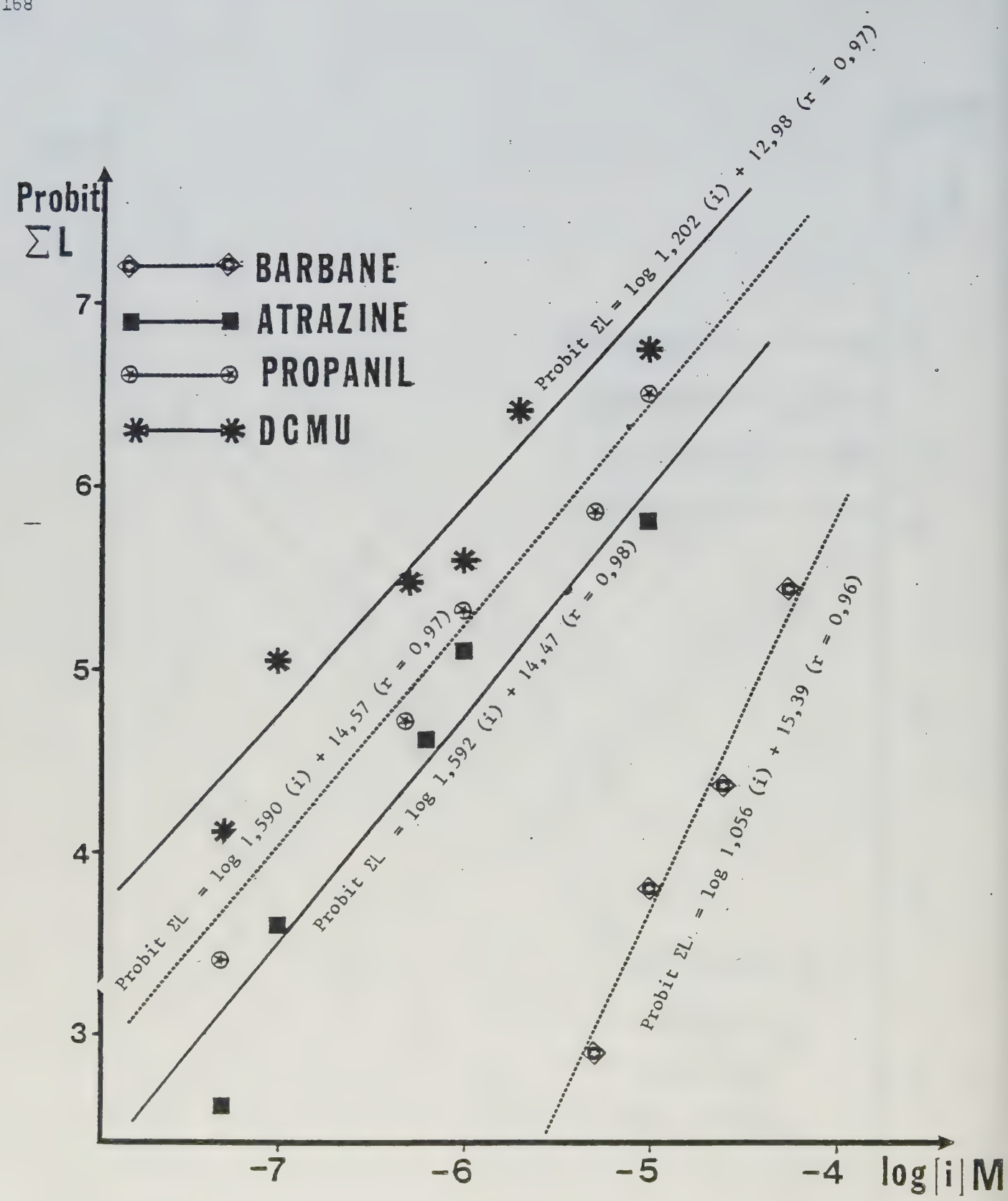


FIGURE 52 - Relation entre le probit de l'intégrale de luminescence ΣL et le log de la concentration en *DCMU, Barbane, Propanil et Atrazine,* obtenue sur chlorelles adaptées à l'obscurité (70 γ chlorophylle/ml). *Les équations des droites correspondantes et les coefficients de corrélation sont indiqués sur la figure pour chaque inhibiteur.*

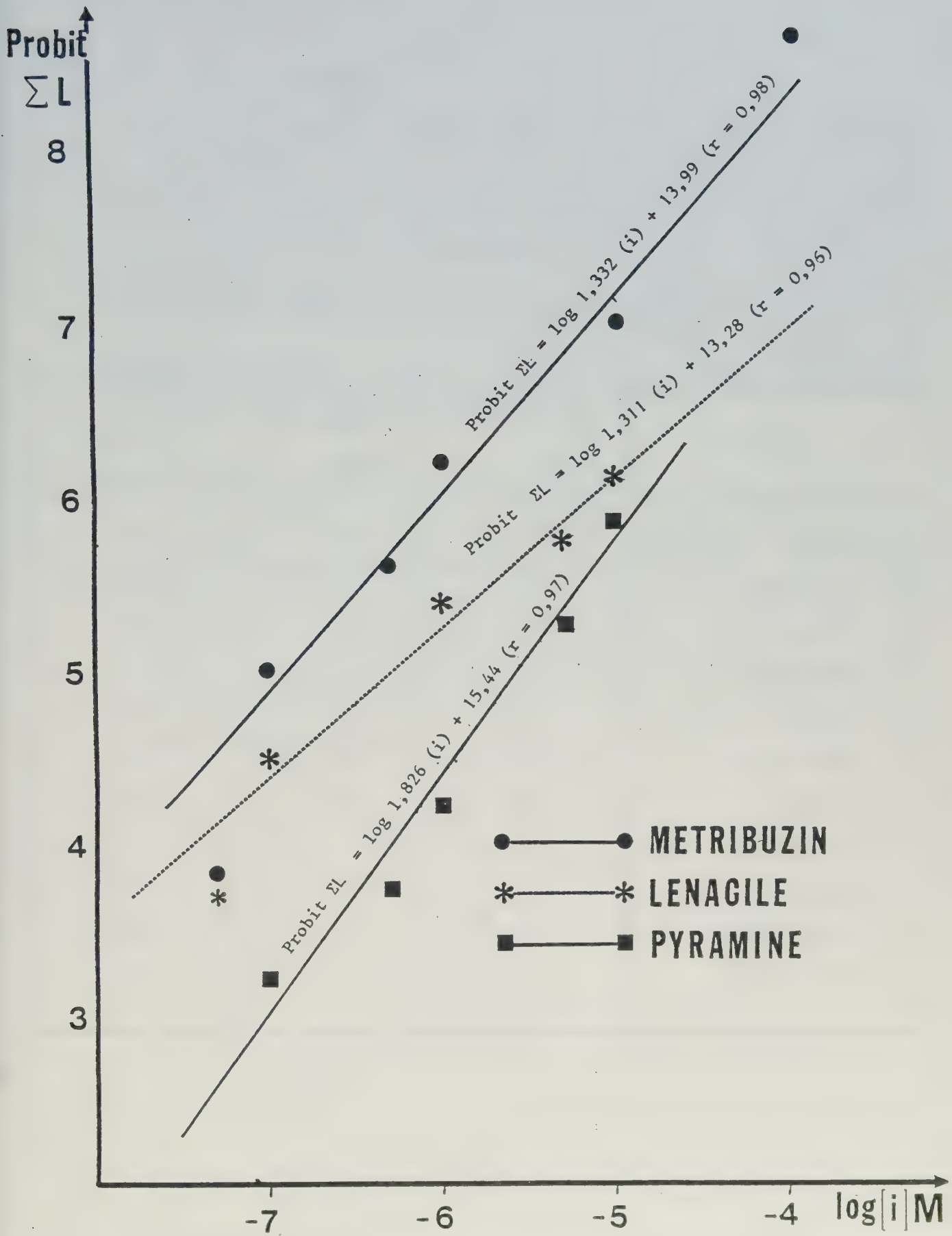


FIGURE 53 - Relation entre le probit de l'intégrale de luminescence ΣL et le log de la concentration en *Métribuzin, Lénacile et Pyramine.* obtenue sur chlorelles adaptées à l'obscurité (70 γ chlorophylle/ml)

Tableau 16

Comparaison entre les concentrations de demi-effets obtenus sur :

Produits	Luminescence initiale pL_{i50}	Intégrale de luminescence $p\ \Sigma L_{50}$	pI_{50} (Ferricyanure)
DCMU	6,80	6,80	6,82
Propanil	6,2	6,2	5,62
Pyramine	6,35	5,6	5,85
Atrazine	5,9	5,8	5,76
Lénacile	6,45	6,3	6,67
Métribuzin	6,8	6,9	6,57
Barbane	4,8	4,84	4,0
Ioxynil	0	0	6,57
RU 21731	5,40	?	5,55
Nitrofène	0	0	4,25
Trifluraline	0	0	4,85

3.4 - Cas de l'Ioxynil

Nous avons vu dans les chapitres précédents, que l'ioxynil pouvait être classé comme inhibiteur de type-DCMU sur la base des mesures d'induction de fluorescence ; toutefois, certaines anomalies étaient apparues notamment dans l'étude des aires complémentaires normalisées et des augmentations de ϕ_0 dans les chloroplastes pré-traités à l'hydroxylamine : une dualité d'action de l'ioxynil avait alors été évoquée. En comparant l'action de cet inhibiteur sur l'induction de fluorescence avec l'absence de déclenchement de la luminescence noire, nous sommes en présence d'une contradiction apparente : dans le premier cas, nous mettons en évidence une inhibition de réoxydation de Q^-, dans le 2ème cas, il ne semble pas y avoir d'effet sur le potentiel redox de B. Il serait évidemment plausible de localiser l'effet de l'ioxynil sur Q et non sur B, mais cette explication ne pourrait rendre compte des augmentations substantielles de ϕ_0 en présence de l'inhibiteur.

En renouvelant un essai de double déclenchement, tel que cela a été réalisé avec RU 21.731 et DCMU, nous pouvons voir dans quelle mesure l'ioxynil agit sur Q ou sur B. En réalisant un premier apport d'ioxynil à 10^{-5}M, aucune luminescence n'est observée ; l'addition consécutive de DCMU 10^{-5}M aux algues ne déclenche pas de luminescence, ce qui tendrait à montrer soit qu'une compétition existe sur le même site (B), soit que la recombinaison de charges ne se produit pas pour une raison quelconque. En se souvenant que les traitements détruisant ou bloquant le côté donneur du PS II (traitement à l'hydroxylamine, chauffage à 50°C de la suspension d'algues), conduisent à l'abolition de la luminescence noire, nous pouvons proposer comme hypothèse de travail que l'ioxynil, bien qu'ayant un site d'action identique à la DCMU, possède un 2ème site situé du côté oxydant du PS II.

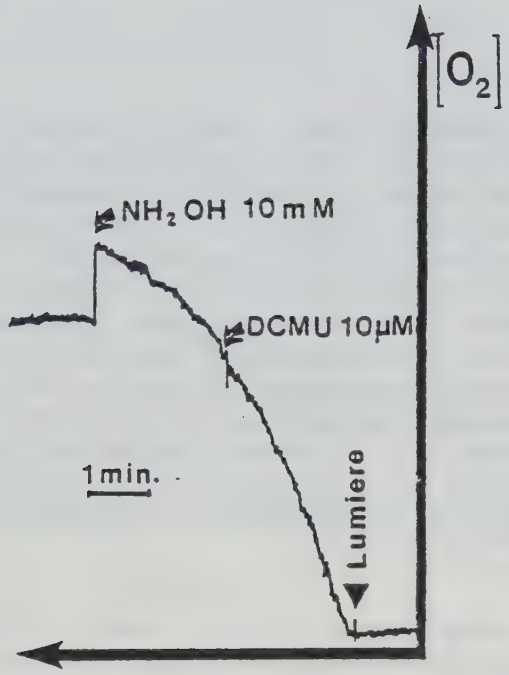


FIGURE 54 C - Effets de DCMU et NH_2OH sur l'évolution de O_2 en présence de SIMO

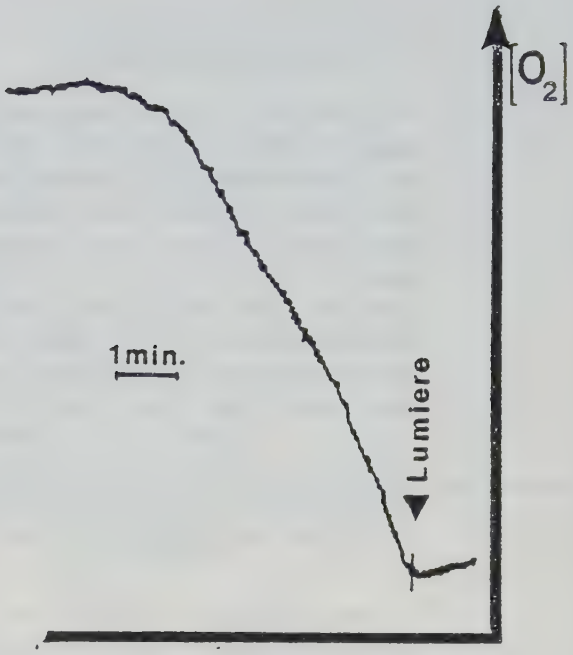


FIGURE 54 B - Dégagement de O_2 en présence de SI Activité spécifique : 193 µmoles O_2/mg chl/heure

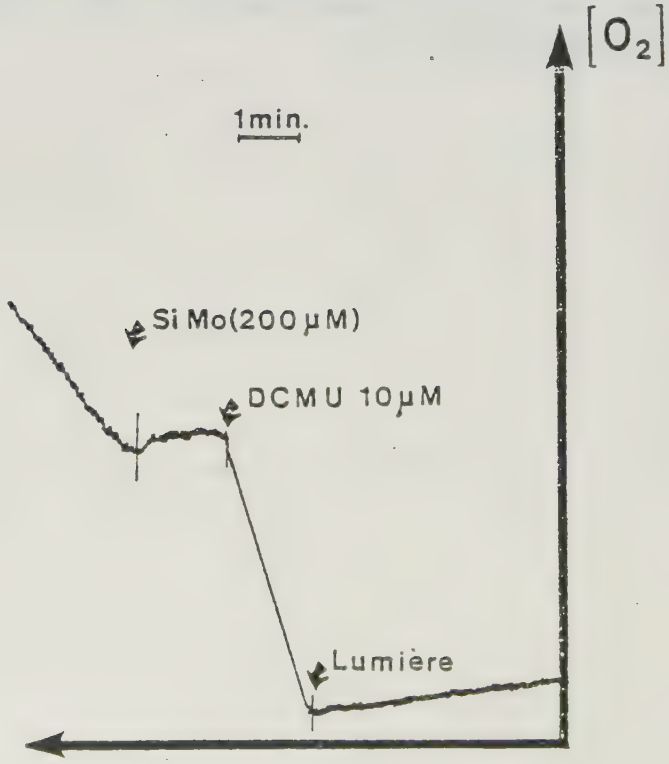


FIGURE 54 A - Dégagement de O_2 en présence de ferricyanure et levée d'inhibition obtenue par DCMU par le SIMO (Activités spécifiques : *ferricyanure* = 270 µmoles - O_2/mg chl/h , *SIMO* = 116 µmoles - O_2/mg chl/h)

3.4.1. Mesure du dégagement d'O_2 en présence d'acide silico-molybdique

Parmi les accepteurs d'électrons du PS II, seuls le Hg Cl_2 (MILES et al, 1973), l'acide silico-tungstique (GIRAULT et GALMICHE, 1974) et l'acide silico-molybdique (GIAQUINTA et DILLEY, 1975) permettent de mesurer une réaction de Hill insensible à la DCMU, l'eau étant le donneur d'électrons. La réduction du silico-molybdate (Si Mo) par PS II se situe en fait avant le site d'action de la DCMU (BARR et al, 1975), bien qu'un 2ème site de réduction ait été proposé entre Q et PQ (PALLETT et DODGE, 1977) : la contribution de ce site à la réduction de Si Mo semble toutefois limitée. Nous pouvons donc mettre à profit cette propriété pour tester l'effet éventuel de l'Ioxynil sur le côté donneur du PS II.

3.4.1.1. - Matériel et Méthode

Les chloroplastes sont extraits selon la technique décrite dans le chapitre II. Le milieu réactionnel est constitué de :

- Na Cl 10 mM
- Sorbitol 50 mM
- Tampon Tris , ph 7,8 10 mM
- Ferricyanure de K 0,5 mM (le cas échéant)
- Acide silico-molybdique 100 µM
- Chloroplastes : équivalent à 30 µg chlorophylle/ml

L'évolution de l'O_2 est mesurée grâce à une électrode polarographique de type CLARK, reliée à un système de mesure YELLOW SPRING INSTRUMENT Model 53 et enregistrée.

3.4.1.2. - Résultats et Discussion

Un certain nombre de points sont en premier lieu vérifiés :

. levée d'inhibition de la DCMU par le Si Mo : en présence de ferricyanure, l'addition de DCMU 10^{-5} M bloque totalement le dégagement d'O_2 ; l'addition de 100 µMoles de Si Mo restitue l'activité photosynthétique (Figure 54 A).

. Evolution d'O_2 en présence de Si Mo et en l'absence de ferricyanure : lorsque le milieu réactionnel contenant les chloroplastes en présence de 100 µM de Si Mo est éclairé, on observe un dégagement d'O_2 (Fig. 54 B) légèrement inférieur, toutefois à celui obtenu avec le ferricyanure comme accepteur ; lorsque le même essai est réalisé en présence de DCMU ajoutée avant le Si Mo , une addition ultérieure supplémentaire de DCMU provoque une légère inhibition (Figure 55 B). Cependant, l'activité spécifique initiale est comparable à celle obtenue en l'absence de DCMU.

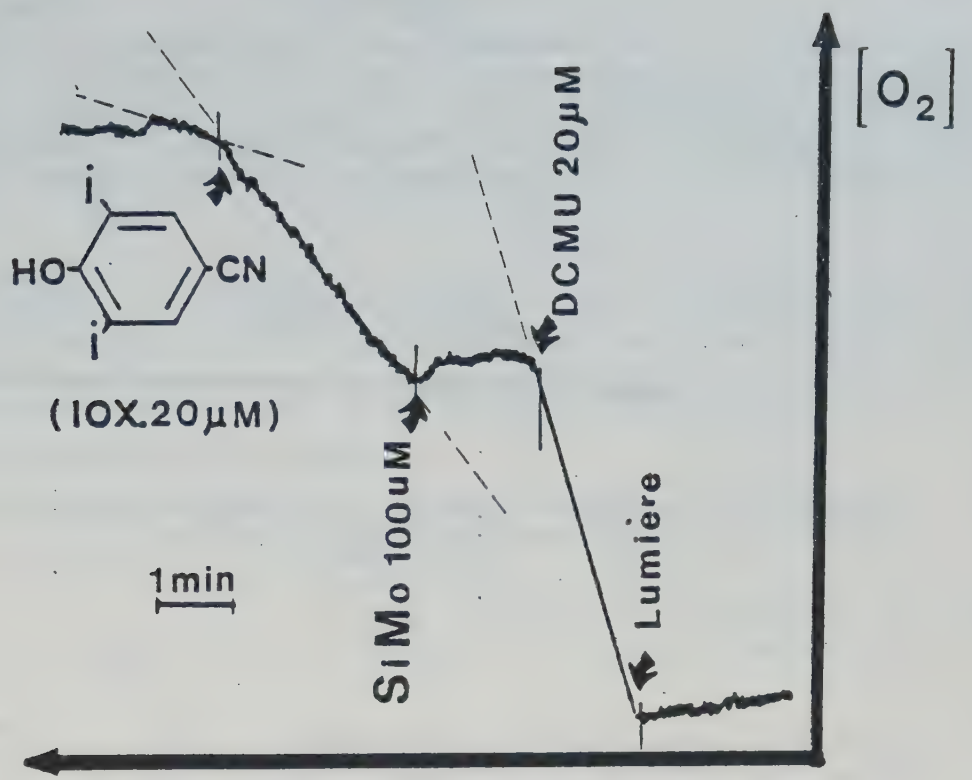


FIGURE 55 A - Evolution d'O_2 en présence de Ferricyanure de K.
L'addition des réactifs et inhibiteurs est indiquée de droite à gauche
(Activité spécifique du témoin = 253 µmoles O_2dégagé/mg chlorophylle/h)

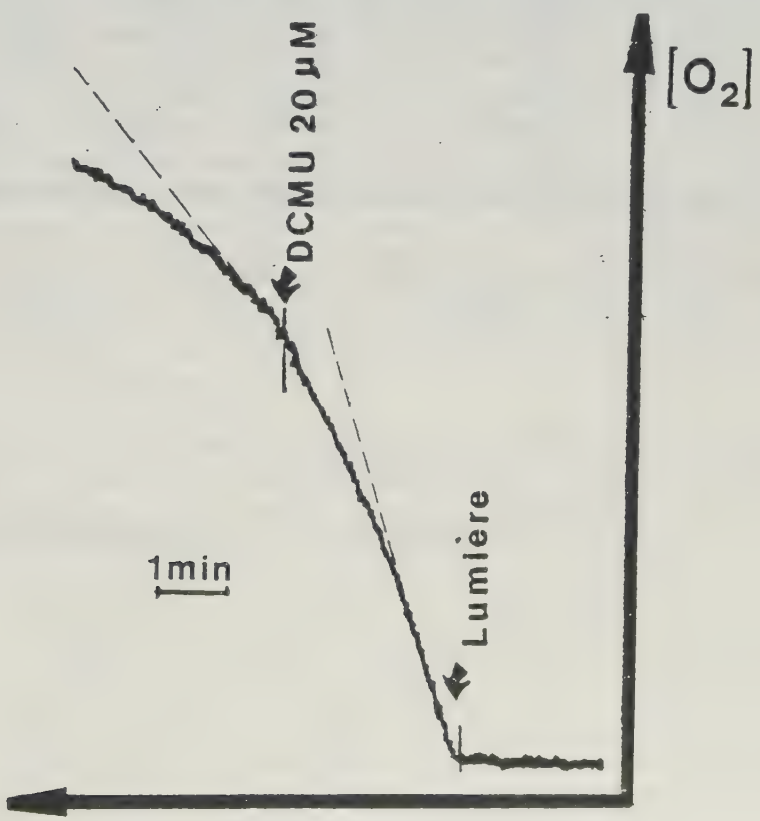


FIGURE 55 B - Evolution d'O_2 en présence de SIMO et de DCMU 10^{-5}M
(Activité spécifique = 201 µmoles, O_2 dégagé/mg chlorophylle/heure)

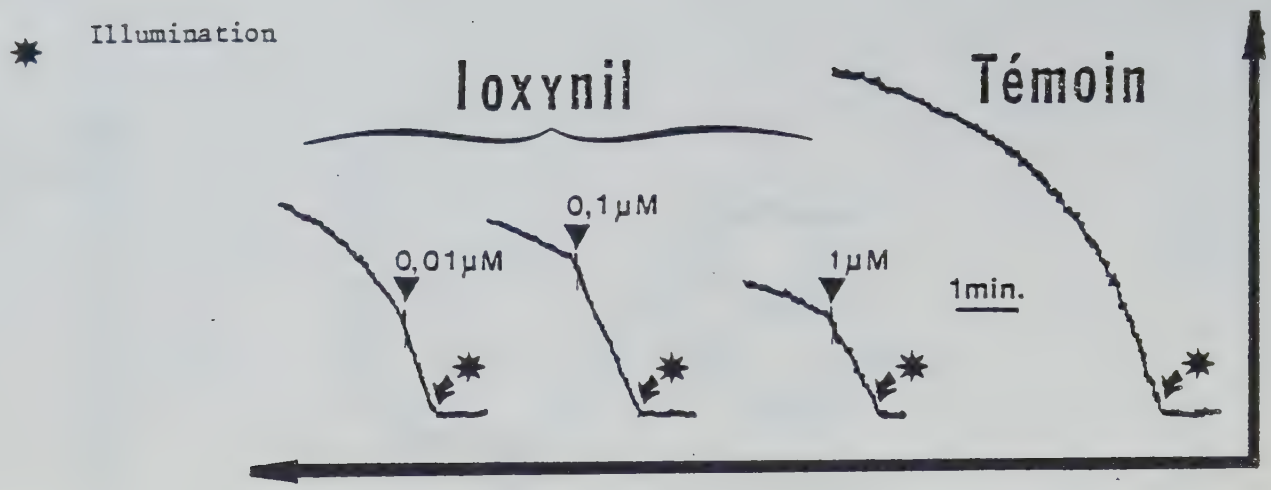


FIGURE 56 A - Additions d'Ioxynil à différentes concentrations dans le milieu réactionnel contenant 200 µM SiMO.

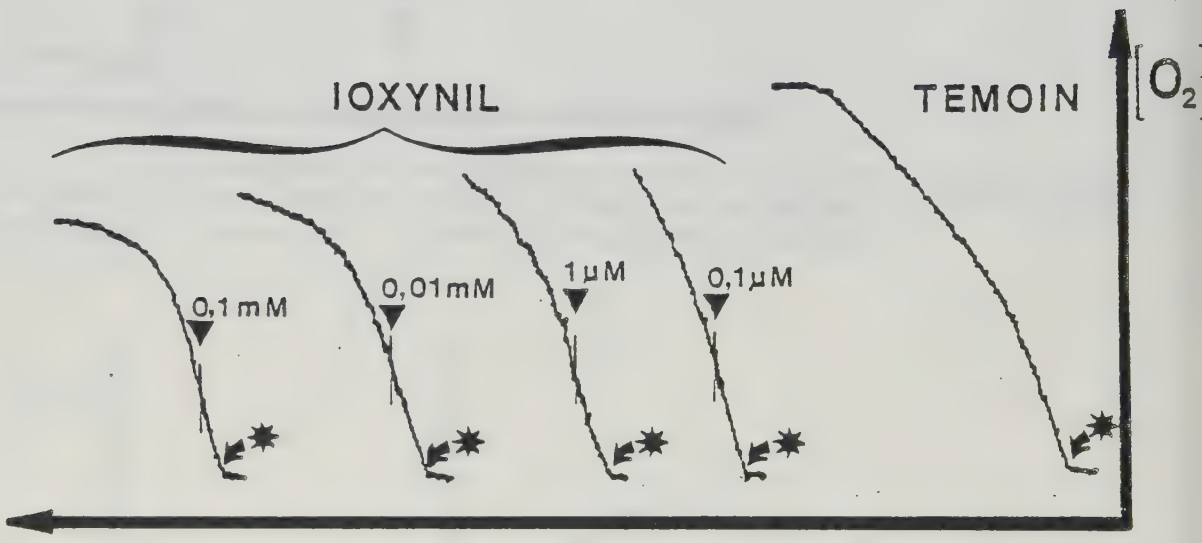


FIGURE 56 B - Addition d'Ioxynil 30 sec après le début de l'illumination ; SiMO 200 µM

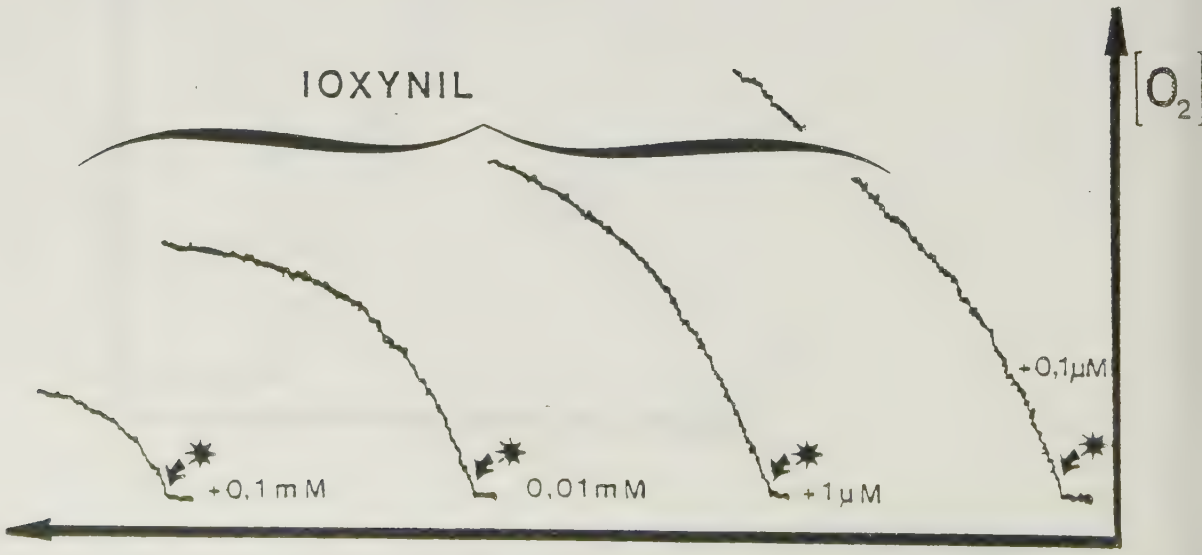


FIGURE 56 C - Pré-incubation d'Ioxynil dans le milieu réactionnel

. Effet de NH_2OH et DCMU sur le dégagement d'O_2 en présence de Si Mo seul : la DCMU à 10^{-5}M n'inhibe que faiblement le dégagement d'O_2 en présence de Si Mo à 100 µM ; NH_2OH à 10 mM bloque totalement ce dégagement (Figure 54 C), ce qui montre que l'évolution d'O_2 observée provient bien de l'eau lorsque Si Mo est accepteur d'électrons.

En illuminant le milieu réactionnel contenant du ferricyanure et en réalisant l'introduction des réactifs et inhibiteurs de la façon suivante (Fig 55 A)

Témoin → DCMU 10^{-5}M ⟶ Si Mo 100 µM ⟶ Ioxynil 10^{-5}M,

on observe les dégagements d'O_2 suivants :

- Témoin : 263 µmoles d'O_2 / mg $^{-1}$Chl / h^{-1}
- DCMU : 0 (blocage total)
- Si Mo 100 µM : 108 µmoles d'O_2 / mg $^{-1}$Chl / h^{-1} (levée partielle de l'inhibition de la DCMU)
- Ioxynil 10^{-5} M : 0 (inhibition totale du dégagement d'O_2).

Ces essais tendent bien à montrer que même lorsque le transport d'électrons entre H_2O et le ferricyanure est bloqué par DCMU, un certain dégagement d'O_2 est restauré par Si Mo, mais que celui-ci est à son tour inhibé par l'Ioxynil, ce qui laisse supposer que cet inhibiteur possède un 2ème site d'action du côté donneur du PS II. Le fait que la restauration de l'évolution d'O_2 par Si Mo ne soit pas complète pourrait indiquer que DCMU peut avoir également une certaine action sur le système d'évolution d'O_2, comme cela a déjà été suggéré (BENNOUN et LI, 1973 - RENGER, 1973), ou qu'il existe un 2ème site de réduction de Si Mo situé entre Q et PQ (PALLETT et DODGE, 1977). Il faut cependant considérer que la cinétique d'évolution d'O_2 en présence de Si Mo n'est pas linéaire, ce qui mène à des erreurs d'estimation sur les taux de dégagement d'O_2 (voir figure 55). De même, l'ordre d'introduction des réactants dans le milieu réactionnel semble important : de KOUCHOVSKY et ARTZEN (communications personnelles) mentionnent d'introduire la DCMU avant Si Mo dans le milieu réactionnel. En prenant ces précautions, et en calculant les activités spécifiques par mesure des tangentes à l'origine des enregistrements obtenus sans DCMU (Figure 54 B) et avec DCMU placé avant Si Mo dans le milieu réactionnel (Figure 55 B), une inhibition d'environ 10 % a été obtenue et est similaire à celle mentionnée pour DCMU dans des conditions expérimentales identiques (BARR et al, 1975).

Ces réflexions mettent en évidence la difficulté de mesurer quantitativement l'effet de l'Ioxynil sur l'évolution d'O_2 en présence de Si Mo ; le dégagement d'O_2 n'est pas linéaire en fonction du temps et un palier est atteint en moins de 5 minutes. Sachant que le dégagement d'O_2 est étroitement dépendant du pH, nous avons pu vérifier qu'entre le début de l'illumination et l'atteinte du palier, le pH passait de 7,4 à 6,8, ce qui pourrait être une explication de l'effet observé. Lorsque la solution d'Ioxynil est injectée dans la cellule de mesure dans un intervalle de temps de l'ordre de 1,5 à 2 minutes, une très forte inhibition apparente est observée (Figure 56.A) : même à 10^{-8}M, l'Ioxynil semble encore inhiber le dégagement d'O_2 en présence de Si Mo. Si l'injection intervient 30 secondes après le début de l'illumination, ce qui est un minimum requis pour l'obtention d'une valeur témoin, les tangentes à l'origine sont impossibles à mesurer (Figure 56.B). La seule possibilité consiste à ajouter dans le milieu réactionnel les substances dans l'ordre suivant : Ioxynil (à diverses concentrations), puis Si Mo 200 µM, ensuite éclairer la suspension chloroplastique.

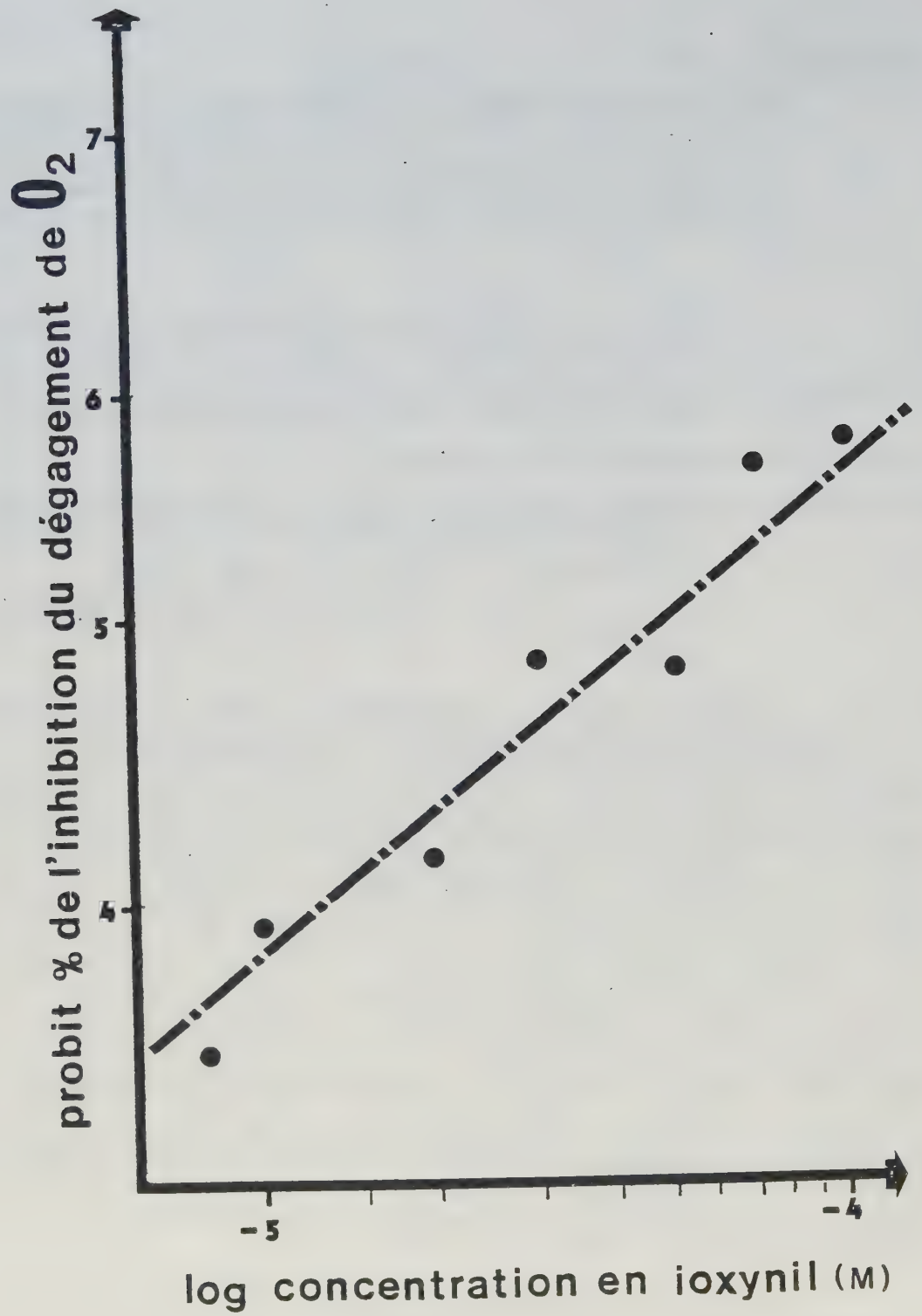


FIGURE 57 - Relation entre le "probit" du pourcentage d'inhibition du dégagement d'O_2 en présence d'acide silicomolybdique et le log de la concentration en ioxynil.

Des enregistrements typiques de dégagement d'O_2 obtenus dans ces conditions sont présentés sur la Figure 56-c. En prenant les tangentes à l'origine des courbes, il est possible de mesurer un pourcentage d'inhibition du dégagement d'O_2 avec Si MO comme accepteur d'électrons, en fonction de concentrations croissantes en ioxynil. En transformant ces pourcentages en leur "probit" et les concentrations en log, une droite est obtenue (Fig. 57). La pI_{50} est mesurée et est égale à environ 4,4. En d'autres termes, la part d'activité de l'ioxynil sur le côté oxydant du PS II est relativement faible par rapport à l'importance de l'inhibition du côté oxydant (action type DCMU), mais néanmoins significative.

En conclusion à ce chapitre, nous pouvons résumer les résultats ainsi :

- les *phénylurées, N-phénylcarbamates, N-acylanilides, s-triazines, triazinones, pyridazinones, uraciles* et dans une certaine mesure les *thiadiazoles* possèdent un site d'action commun (B)

- l'Ioxynil (*hydrobenzonitrile halogéné*) possède une action sur B, comme les inhibiteurs de "type-DCMU", ainsi qu'un site d'action secondaire au niveau du système de photooxydation de l'eau

- les *dinitroanilines* (trifluraline) et *diphényléthers* (nitrofène) sont à exclure du groupe des inhibiteurs de "type-DCMU"

D'une manière générale, il peut être déduit que :

1. Les inhibiteurs de type purement DCMU sont vraisemblablement sans effet sur le côté donneur du PS II.

2. En corollaire au point 1, les mesures de luminescence noire constituent un test spécifique d'une action sur B et donnent une indication de l'effet de xénobiotiques ou de traitements variés sur les états S.

3. Les inhibiteurs de "type-DCMU" possèdent une réactivité chimique, à l'obscurité, vis-à-vis de B.

CHAPITRE IV

ACTION DES INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHESE SUR LES VARIATIONS D'ABSORPTION À 519 NM INDUITES PAR UN ÉCLAIR ACTINIQUE

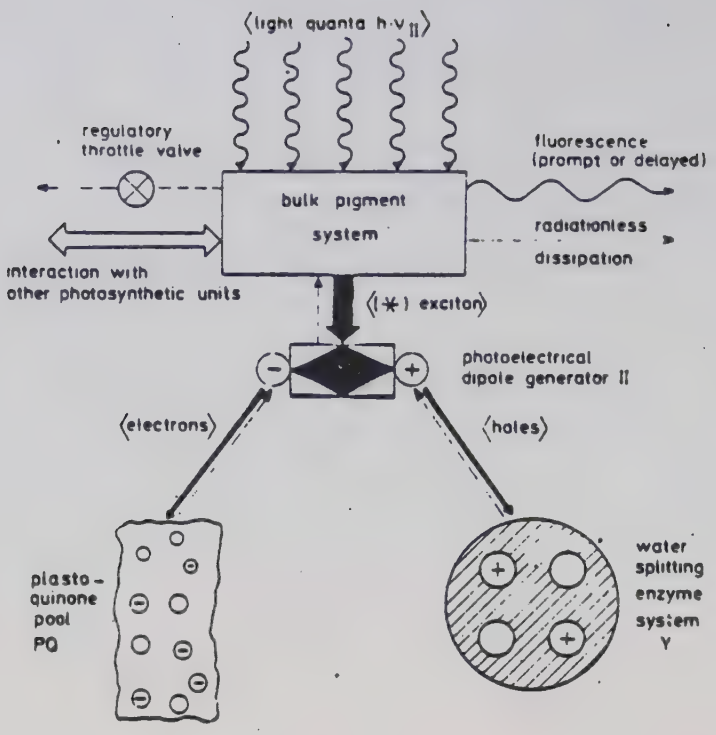


FIGURE 58 Schéma de l'organisation fonctionnelle du PS II (RENGER, 1974)

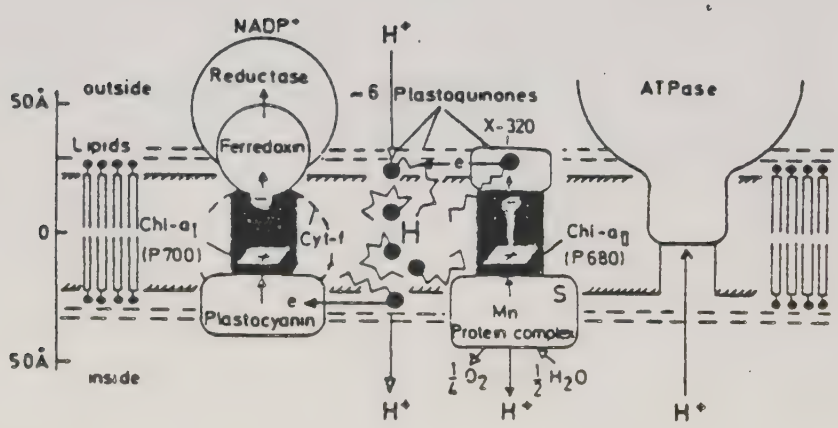


FIGURE 59 - Représentation de la topographie de la membrane photosynthétique montrant 2 générateurs dipoles I et II (WITT, 1976)

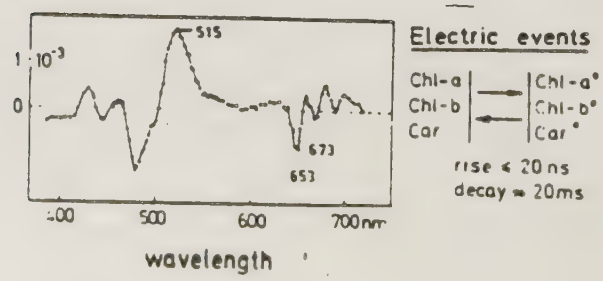


FIGURE 60 - Spectre différentiel transitoire indiquant la présence d'évènements électriques en photosynthèse (EMRICH et al, 1969)

1 - INTRODUCTION

L'énergie d'excitation électronique des chlorophylles a_I et a_{II}, dans les PS I et PS II respectivement, est transformée en énergie électrochimique, conduisant à la désignation de PS I et PS II comme *générateurs dipoles I et II*. Ces générateurs photoélectriques sont couplés à deux unités opérationnelles essentielles :

- L'ensemble du système pigmentaire qui régule l'influx d'excitations produites par les quanta lumineux dans les générateurs dipoles.

- Les systèmes transporteurs d'électrons qui régulent l'efflux de charges électriques (électrons et trous) à partir des générateurs dipoles.

Ces unités opérationnelles sont schématisées pour le PS II sur la figure 58 (RENGER - 1974) et constituent un appareil transformant l'énergie lumineuse en énergie électrochimique. A partir de ce concept, la topographie de la membrane photosynthétique peut être représentée d'une façon imagée comme cela est montré sur la Figure 59(WITT - 1976).

L'observation de l'apparition d'un champ électrique induit par la lumière peut être effectuée de différentes façons :

- Par des méthodes indirectes utilisant la mesure du degré d'énergie de dissipation (non photochimique) liées au processus d'efflux d'énergie en tant qu'indicateur de l'état fonctionnel du générateur dipole ; ces méthodes requièrent la présence d'une stoechiométrie stricte entre l'énergie de dissipation et le fonctionnement du dipole.

- Par des méthodes directes permettant de mesurer le fonctionnement du générateur dipole lui-même. Une observation directe d'un champ électrique induit par la lumière a été réalisée par FOWLER et KOK (1974). Mais depuis l'observation d'une variation spectrale à 515 nm à la lumière, faite par DUYSENS (1954) avec les chlorelles, l'adaptation du concept de l'électrochromisme aux organes photosynthétiques s'est développée. En effet, l'électrochromisme se définit comme étant l'influence d'un champ électrique sur les bandes spectrales de colorants exposés à ce champ ; il a été établi expérimentalement sur des pigments chloroplastiques *"in vitro"* (SCHMIDT et al, 1971) à la suite d'études cinétiques réalisées par JUNGE et WITT (1968) et des mesures spectrométriques différentielles (Figure 60)(EMRICH et al, 1969) qui corrélait celles-ci avec les effets électrochromiques obtenus avec ces pigments *"in vivo "*, mesurés par SCHMIDT et al (1971).

Nous avons vu au cours de précédents chapitres que les inhibiteurs étudiés se subdivisaient en 2 groupes principaux : les inhibiteurs de type DCMU et ceux possédant un site d'action différent. Nous avons également signalé que certains de ces produits possédaient une activité découplante de la photophosphorylation, et qu'ils semblaient dépourvus d'effet sur le PS I. Les progrès réalisés dans les techniques spectrométriques par impulsion ou par éclairs ont permi de faire avancer considérablement la connaissance des relations existant entre l'apparition et la relaxation du champ électrique (mesuré par les variations d'absorbance à 515 nm) et le fonctionnement des photocentres PS I et PS II, ainsi que la photophosphorylation.

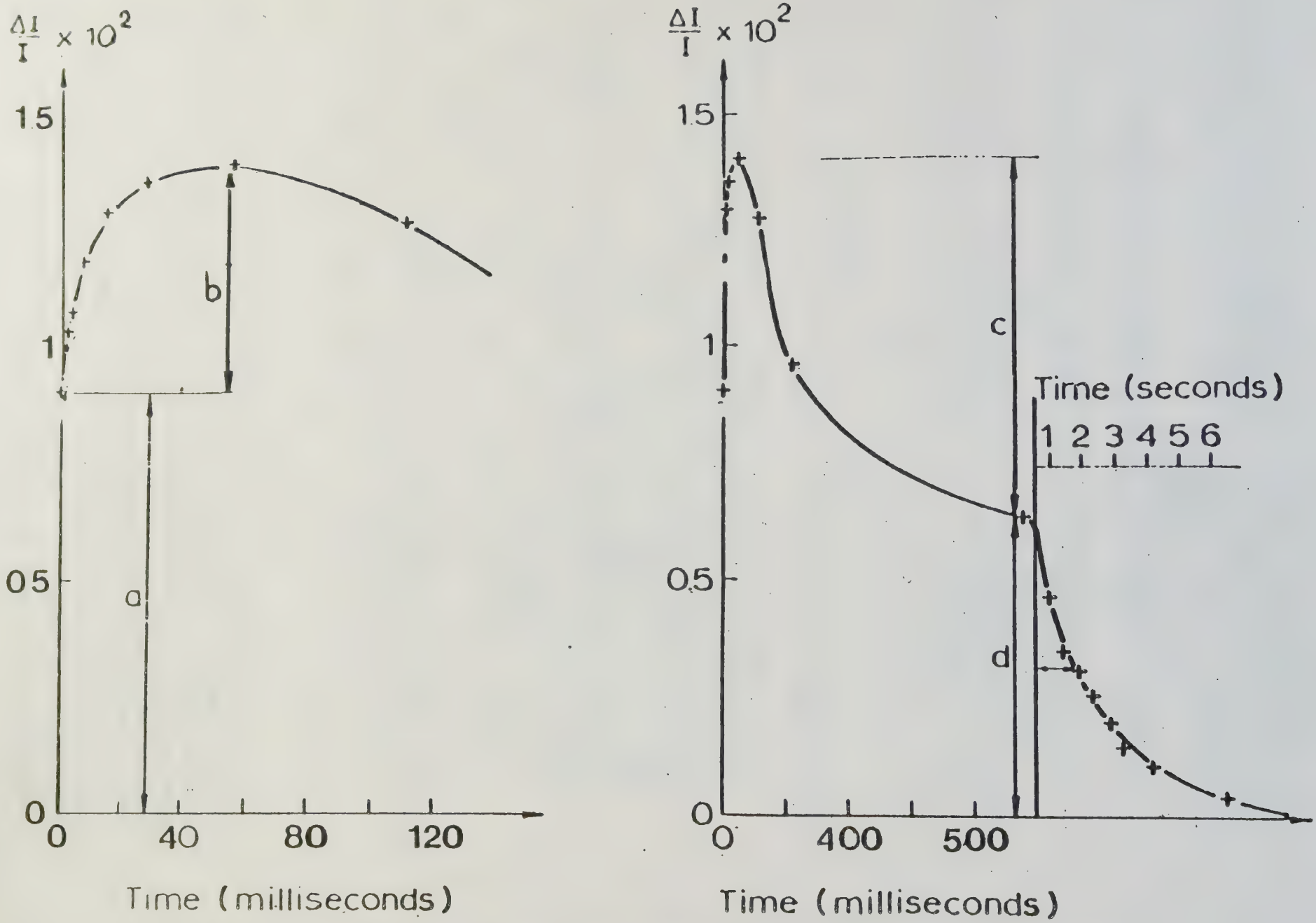


FIGURE 61 - Variation de l'absorbance à 519 nm après un éclair actinique de chlorelles (JOLIOT et DELOSME, 1975)

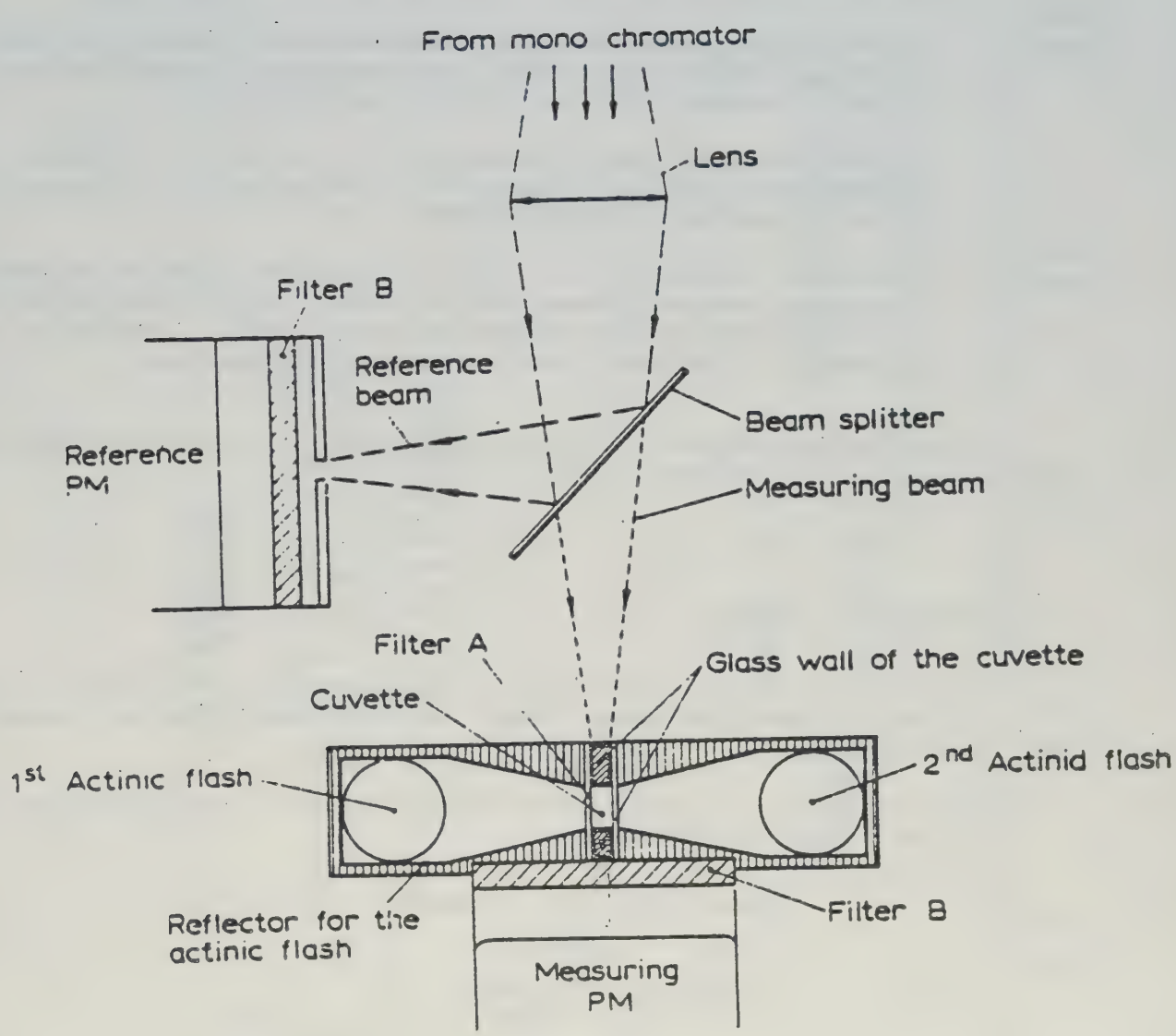


FIGURE 62 - Schéma du montage destiné à la mesure des variations d'absorption à 519 nm après application d'un ou plusieurs éclairs actiniques (JOLIOT et DELOSME, 1975)

A cet égard, la méthodologie mise au point par JOLIOT et DELOSME (1974) permet d'étudier d'une façon élégante, et *"in situ"*, l'influence de nos inhibiteurs sur l'activité PS II, PS I et la photophosphorylation.

En effet, ces auteurs montrent que, après illumination d'une suspension d'algues par un court flash actinique (3 µsec), les variations d'absorbance à 515 nm présentait les caractéristiques suivantes (Figure 61) :

- montée rapide, d'une demi-vie probablement de l'ordre de 20 nano-secondes (EMRICH et al , 1969), appelée phase a et attribuée à 60-80 % d'activité PS I et 20-40 % d'activité PS II
- augmentation plus lente d'absorption de l'ordre de 1 à 50msec, nommée phase b et qui serait liée à la réduction de la plastocyanine et du cytochrome f (BOUGES-BOCQUET, 1977)
- diminution biphasique, de l'ordre de plusieurs centaines de msec à quelques secondes (phases c et d), liée à la photophosphorylation, la disparition du champ électrique correspondant à l'extrusion de protons de l'intérieur vers l'extérieur du thylacoïde.

Nous avons donc étudié l'effet des inhibiteurs sur ces variations transitoires de l'absorption à 519 nm.

2 - MATERIEL ET METHODES

Ce travail ayant été réalisé dans le laboratoire de Mr. JOLIOT, l'appareillage utilisé est identique à celui décrit par JOLIOT et DELOSME et schématisé sur la figure 62.

Dans nos essais, les séquences d'éclairs actinique et détecteurs sont réalisées de la façon suivante :

Eclair actinique (3 µsec)
↓ 104 µsec
1er éclair détecteur
↓ 27 msec
2è éclair détecteur
↓ 27 msec
3è éclair détecteur
etc ..

} 1ère Série

Eclair actinique (3 µsec)
↓ 104 µsec
1er éclair détecteur
↓ 432 msec
2è éclair détecteur
etc ..

} 2ème Série

Les inhibiteurs sont solubilisés dans l'éthanol.

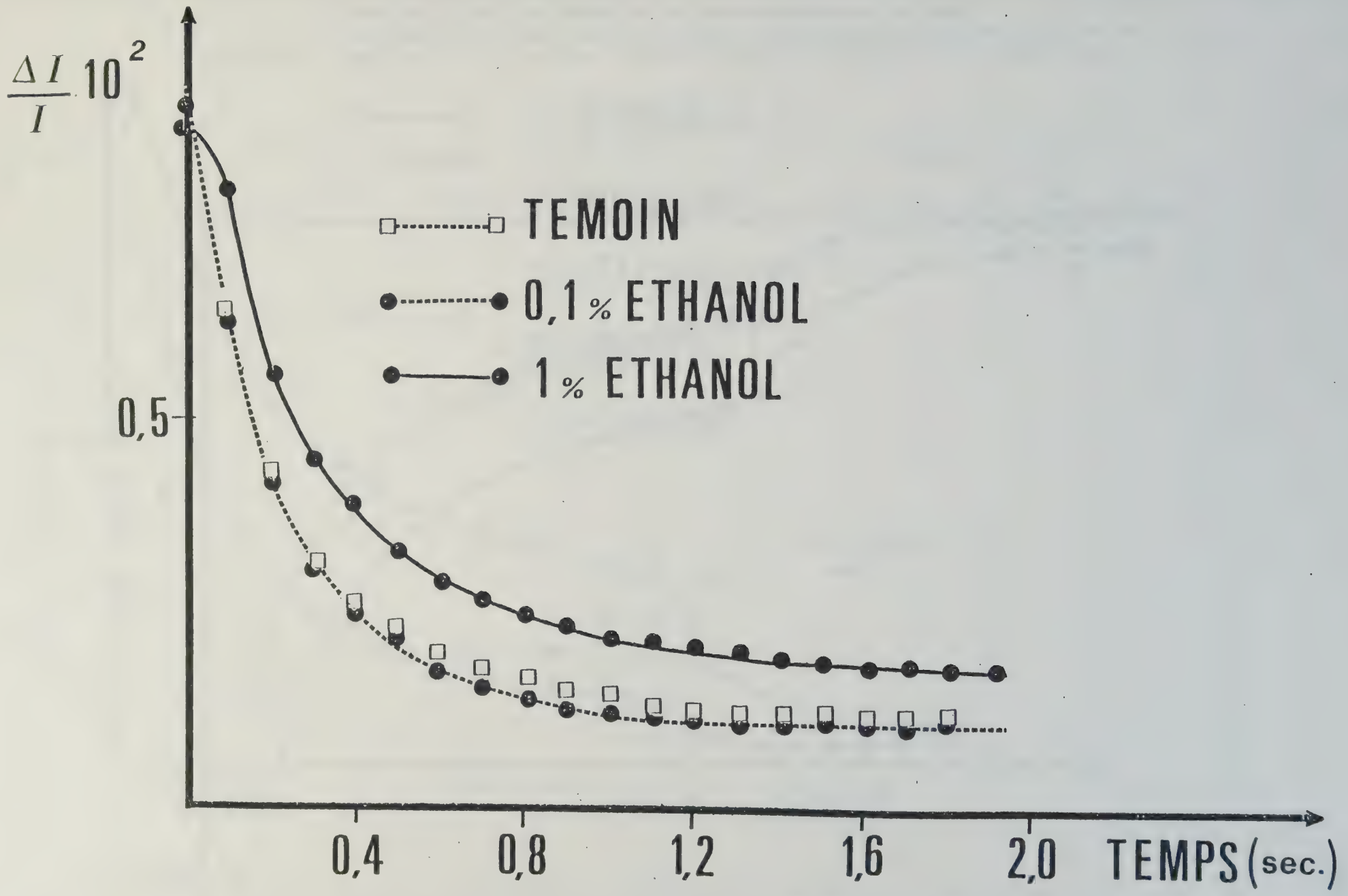


FIGURE 63 - Effet de l'éthanol sur la relaxation du champ, mesurée par la décroissance de la D.O. à 518 nm sur chlorelles

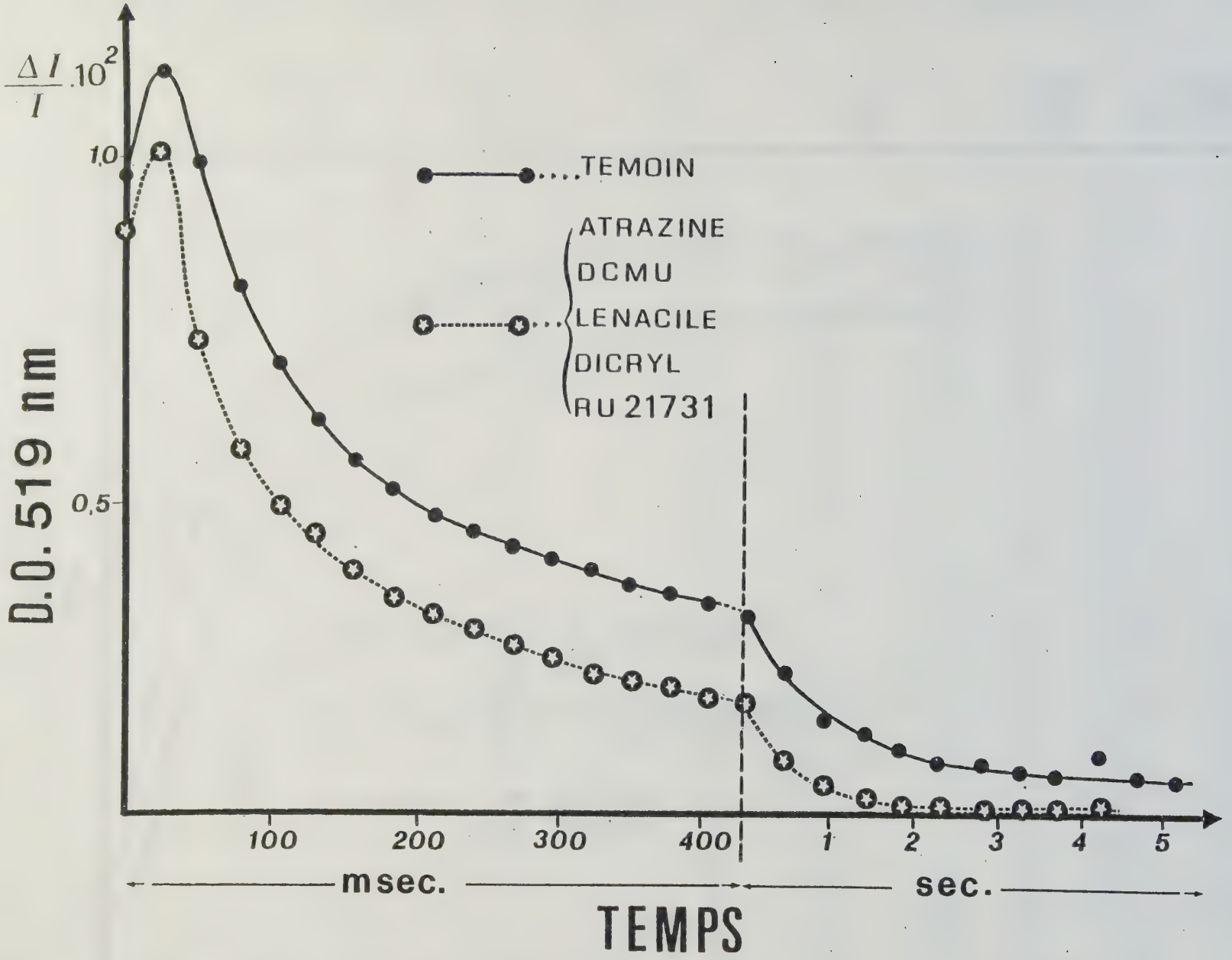


FIGURE 64 - Effets de l'Atrazine, DCMU, lénacile, dicryl et RU 21731 sur l'apparition et la relaxation du champ, mesurées par les variations d'absorption à 519 nm, sur chlorelles (éclair actinique → 1èr éclair détecteur 104 µsec)

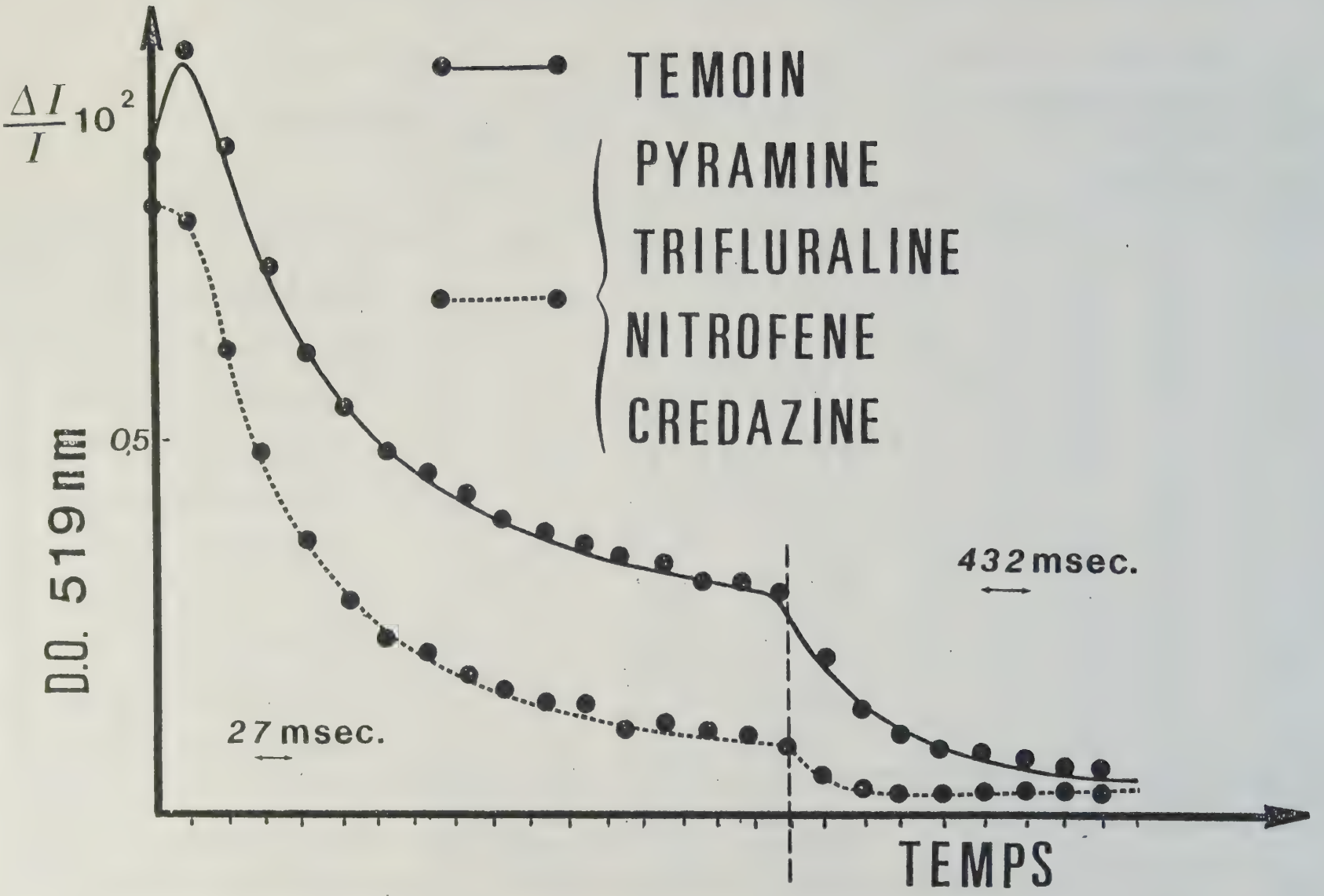


FIGURE 65 - Effets de la Pyramine, trifluraline, nitrofène et crédazine sur l'apparition et la relaxation du champ, mesurées par les variations d'absorption à 519 nm, sur chlorelles (éclair actinique → 1èr éclair détecteur : 104 µsec)

TABLEAU 17- Comparaison entre les mesures de variation d'absorption à 519 nm en présence des inhibiteurs de photosynthèse et leur classification.

Produits	Inhibition de type - DCMU	Inhibiteur découplant	Δ D O 519 nm		
			Phase a	Phase b	Phases c+d
D C M U *(N-phényl-urée)*	+	-	+	-	-
Dicryl *(N-acylanilide)*	+	+	+	-	-
Atrazine *(s-triazine)*	+	-	+	-	-
Lénacile *(uracile)*	+	-	+	-	-
Ioxynil *(benzonitrile)*	+	+	-	-	-
Pyramine *(pyridazinone)*	+	-	±	+	+
RU 21731 *(thiadiazole)*	±	+	+	-	-
Nitrofène *(diphényléther)*	-	-	±	+	+
Crédazine *(phénoxypyridazine)*	-	-	±	+	+
Trifluraline *(dinitroaniline)*	-	+	±	+	+

Les signes + ou - indiquent que les inhibiteurs peuvent être classés dans la catégorie représentée par chaque colonne :

. inhibition de type-DCMU : identité avec le mode et le site d'action de DCMU démontrée précédemment par les mesures de fluorescence (Chapitre : I) et de luminescence (Chapitre :II)

. inhibiteur découplant : classification proposée dans le Chapitre II - 1ère partie.

. ΔDO_{519} :

- phase a : la diminution de son amplitude correspondrait à l'inhibition du PS II
- phase b : attribuée à l'inhibition de la réduction du cyt. f et de Pc
- phases c + d : l'accélération de la décroissance de DO à 519 nm serait imputable à un effet découplant

3 - RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons dans un premier temps, vérifié l'effet de l'éthanol à 1 % en concentration finale ; dans ce cas, la détection est effectuée toutes les 108 msec. La représentation graphique obtenue à partir des valeurs de variations absorption à 519 nm est présentée sur la figure 62 qui montre qu'une concentration de 1 % en éthanol a tendance à ralentir la vitesse de relaxation du champ par rapport au témoin"eau". L'apport d'éthanol à une concentration finale de 0,1 % ne change pas la cinétique de relaxation d'absorption à 519 nm (Figure 63). Nous solubiliserons donc les inhibiteurs dans l'éthanol à 0,1 %, ce qui implique de ne travailler qu'à des concentrations finales en inhibiteurs de 10^{-5}M.

En utilisant le protocole décrit dans la section "Matériel et Méthodes", on distingue des groupes de substances possédant un effet similaire sur les variations de DO à 519 nm, après un éclair actinique :

- DCMU, Atrazine, Lénacile, Dicryl (choisi en remplacement de propanil) et RU 21731 (Figure 64) : l'amplitude de la phase a est réduite d'environ 20 % (le pourcentage varie en fonction de l'inhibiteur) mais la phase b reste inchangée. Le résultat peut être interprété comme reflétant l'inhibition de l'activité PS II par ces inhibiteurs (JOLIOT et DELOSME, 1974). Dans ces conditions, l'activité du PS I ne serait pas affectée. Les phases c et d restent intactes comparées au Témoin, ce qui semble indiquer qu'aucune interférence sur la phosphorylation n'est obtenue.

- Trifluraline, Nitrofène, Crédazine et Pyramine : l'amplitude de la phase b est considérablement réduite, tandis que celle de la phase a est diminuée dans une moindre mesure, comparée à ce qui est obtenu avec les inhibiteurs du premier groupe (Figure 65). Par ailleurs, la vitesse de décroissance de l'absorption à 519 nm (phases c + d) est notablement accélérée.

- Ioxynil : les variations d'absorption à 519 nm ne diffèrent pas de façon substantielle par rapport au témoin "éthanol" , sur aucune des phases décrites précédemment (Figure 66 - page 192).

Le but des essais décrits dans ce chapitre était de mettre à profit une technique de mesure de variation du champ électrique dans la membrane du thylacoïde, reflétée par l'absorption à 519 nm, pour tenter de mesurer simultanément et *"in situ"*, les effets des inhibiteurs sur les photocentres I et II et sur la phosphorylation. En sélectionnant certains résultats obtenus précédemment et en les comparant avec les mesures de ΔDO_{519} (Tableau 17), nous voyons apparaître un certain nombre de résultats semblant contradictoires :

- La diminution de la valeur de la phase a pour la *DCMU*, le *dicryl*, l'*atrazine*, le *lénacile* et le RU *21731*, semble bien imputable à une inhibition de la "composante" PS II de cette phase. Toutefois, la Pyramine qui a été considérée jusqu'ici, et sans ambiguïté, comme un inhibiteur de type DCMU, ne réduit pas l'amplitude de la phase a d'une façon aussi importante que les produits cités ci-dessus ; cependant, il est difficile de dire dans quelle mesure cette différence est significative.

- La forte diminution de la phase b observée avec la *trifluraline*, le *nitrofène* et la *crédazine*, corrobore l'hypothèse d'un site d'action différent de la DCMU. La phase b semblant correspondre à la réduction du cytochrome f et de la plastocyanine chez *Chlorella pyrenoïdosa* (BOUGES-BOCQUET, 1977), nous pouvons déduire en première approximation que le site d'action de ces inhibiteurs serait à ce niveau, comme cela a été suggéré par ROBINSON et al (1977) pour la *trifluraline* et dans

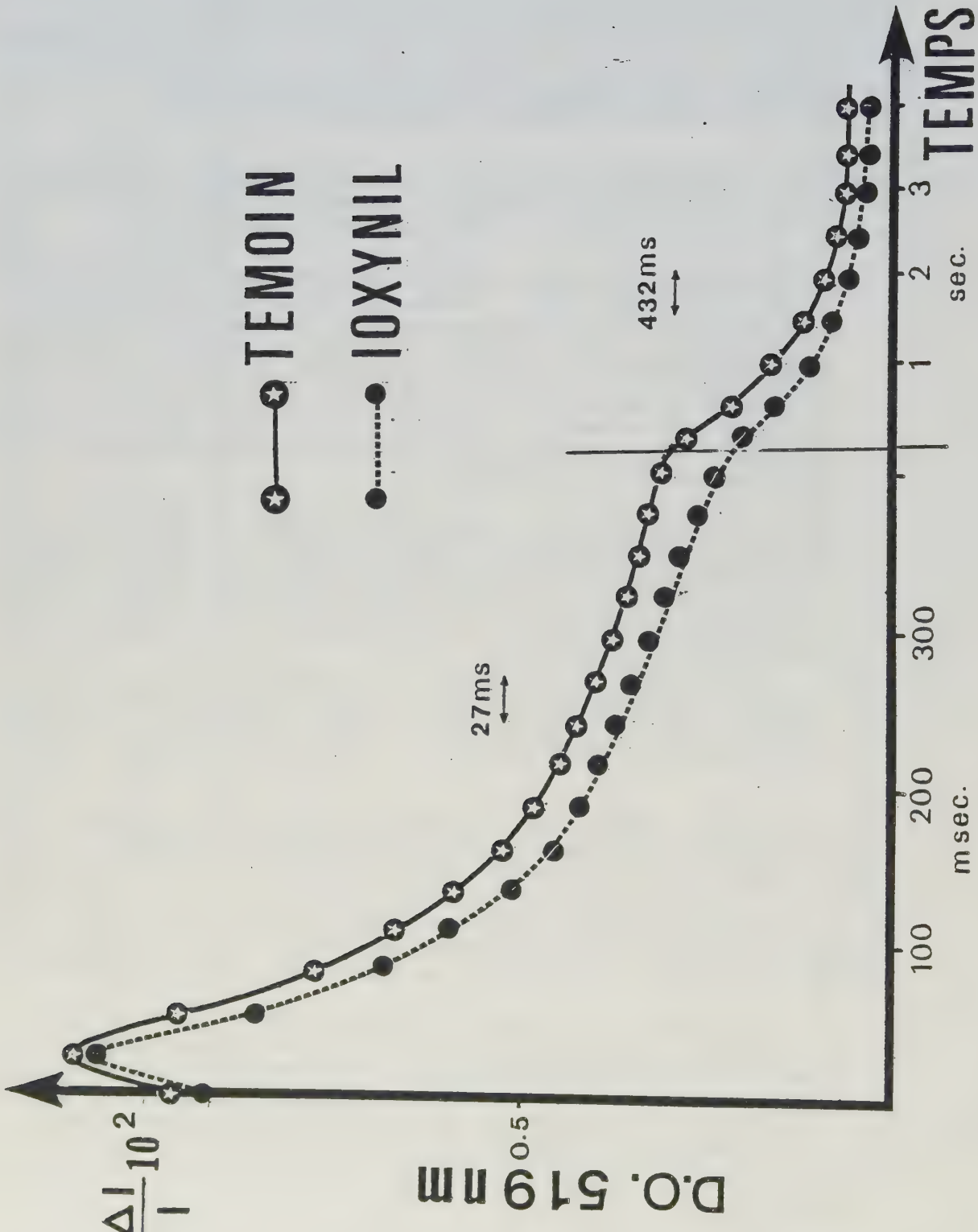


FIGURE 66 - Effets de l'Ioxynil sur l'apparition et la relaxation du champ, mesurées par les variations d'absorption à 519 nm, sur chlorelles (éclair actinique -- 1èr éclair détecteur 104 µsec)

une certaine mesure par TREBST et DRABER (1979) pour une dinitroaniline (*la fuchloraline*) et des *diphényléthers*, bien que les auteurs estiment le site d'action de ces produits plus proche de PQ que du cytochrome f.

La diminution de l'amplitude de la phase b par la pyramine reste difficile à expliquer si ce n'est que par la possibilité d'un site d'action secondaire au niveau plastocyanine ou cytochrome f.
Toutefois, il faut remarquer que la phase b se situe dans un intervalle de temps de l'ordre de 1 à 50 msec, de sorte que dans nos essais, un nombre de points suffisant pour une estimation précise de cette phase n'est pas atteint (détection toutes les 27 msec).

- La *pyramine*, la *trifluraline*, le *nitrofène* et la *crédazine*, accélèrent la relaxation du champ (correspondant à la phosphorylation). Ce résultat pourrait être interprété en termes d'effet découplant ; malheureusement, le tableau 17 montre qu'il n'y a pas de correspondance stricte entre des essais tendant à montrer que les produits étudiés sont des "inhibiteurs découplants" et les mesures des phases c + d : ni la Pyramine, ni le Nitrofène, ni la Crédazine n'ont les caractéristiques de découplants (voir Chapitre II), alors qu'ils accélèrent notablement la relaxation du champ. Au contraire, des inhibiteurs classés dans cette catégorie (N-acylanilides, thiadiazoles) n'ont pas d'influence détectable sur la phase c + d. Seule la trifluraline possède les caractéristiques requises dans les deux types d'essais. Nous avons déjà insisté sur l'ambiguïté du terme "découplant" ; il faut de plus mentionner que, selon la théorie de MITCHELL, pour qu'il y ait phosphorylation, un gradient de protons doit être créé au-travers de la membrane, ce gradient étant lié à l'apparition et à la décroissance du champ électrique (voir : WITT, 1979). Dans nos conditions expérimentales, un seul éclair est capable de déclencher une phosphorylation dans la mesure où un potentiel électrique est produit, mais le gradient de protons reste négligeable (JOLIOT et DELOSME, 1974).
Toutefois, il a été récemment démontré qu'à l'obscurité un gradient substantiel de protons existe, vraisemblablement suffisant pour obtenir une phosphorylation (JOLIOT, communication personnelle). Par ailleurs, le champ électrique pourrait exister dans le thylacoïde sans qu'un effet électrochromique ne soit observé (RENGER et SCHMID, 1977).
Enfin, il est possible que les inhibiteurs soient eux-mêmes capables d'opérer des transferts de charge au-travers de la membrane du thylacoïde : ce transport "parasite" pourrait évidemment changer considérablement l'évolution du champ électrique et par conséquent les variations électrochromiques. Par suite, il n'est pas étonnant de constater l'absence de corrélation entre les mesures d'effets découplants par les méthodes décrites dans le Chapitre II et les résultats mentionnés ici. L'accélération de la décroissance de la phase c + d est vraisemblablement attribuable à un changement dans la conformation, ou à la fluidité de la membrane du thylacoïde, comme cela a été proposé pour un certain nombre d'inhibiteurs (PRITCHARD et WARREN, 1979 , MORELAND et HUBER, 1979), les variations possibles de la conductivité protonique pouvant ne pas être observées dans nos conditions expérimentales.

- Cas de l'Ioxynil :

Cet inhibiteur ne change l'amplitude d'aucune des phases d'apparition et de disparition du champ électrique, ce qui semble inexplicable puisque nous avons émis l'hypothèse que cette substance possédait une action de type-DCMU et un site secondaire du côté oxydant du PS II : on pourrait s'attendre dans ce cas à un renforcement de l'effet de cet inhibiteur sur le champ, par le biais de son interférence avec une (ou plusieurs) charge (s) S. La DCMU et, par extension, les inhibiteurs du même type, peuvent réduire le nombre des centres réactionnels du PS II (JOLIOT et JOLIOT, 1973). Si tel est le cas, il est possible de spéculer sur une action des inhibiteurs sur le dipole lui-même. Toutefois, il devient, dans ces conditions, difficile d'imaginer comme un champ électrique peut se former lorsque les générateurs dipoles sont non-fonctionnels ; à cette question, BOUGES-BOCQUET (1977) donne une réponse en proposant un modèle dans lequel la génération d'un champ électrique en l'absence d'une séparation de charge proviendrait d'une séquence de transporteur d'électrons au travers de la membrane du thylacoïde "couplée" à un transporteur de protons T, ce dernier pouvant être une quinone. L'ensemble formant une "pompe" à hydrogène ($H^+ + e^-$) non couplée aux réactions d'oxydo-réduction peut constituer un système transporteur d'hydrogène (HAUSKA et TREBST, 1977). Le pool de PQ avait d'ailleurs déjà été proposé par MITCHELL (1966) comme candidat possible pour une telle pompe. Toutefois, il est impossible de prévoir l'effet des inhibiteurs de type-DCMU sur ce système. Il semble plus raisonnable de penser, dans le cas de l'ioxynil, que l'action de ce produit sur B est nettement plus faible que celle de la DCMU, résultat en un effet négligeable sur la phase a notamment.

En conclusion, il semble que l'utilisation d'une méthode de mesure des variations de champ électrique par électrochromisme, après application d'un éclair actinique sur des chlorelles, ne constitue pas la méthode particulièrement appropriée à l'étude de l'effet des inhibiteurs du transport d'électrons ou des "inhibiteurs découplants" sur la photosynthèse.

CHAPITRE V

ETUDES DE COMPETITION ENTRE LES INHIBITEURS DE PHOTOSYNTHÈSE

1 - INTRODUCTION

Dans les chapitres précédents, nous avons accumulé un certain nombre de preuves de l'existence d'un site commun d'action des inhibiteurs de photosynthèse, en essayant de préciser la nature possible de ce site.

Certaines de ces techniques, dont certaines présentent un degré de sophistication élevé, laissent parfois dans l'ombre des méthodes plus simples qui, si elles possèdent l'inconvénient de méconnaître la nature chimique exacte de la "cible", ont au moins l'avantage de préciser si les inhibiteurs peuvent entrer en compétition entre eux au niveau du site d'action. La tâche est considérablement facilitée lorsque l'on dispose d'un inhibiteur de "type DCMU" marqué par un isotope radioactif.

Le concept d'une liaison possible entre un inhibiteur de photosynthèse et le chloroplaste provient de l'observation suivante : lorsqu'une certaine concentration en inhibiteur est ajoutée à une préparation chloroplastique et que celle-ci est centrifugée, la teneur du surnageant en inhibiteur est significativement abaissée. Le dosage de cette teneur peut être effectuée soit chimiquement, soit en ajoutant une préparation de chloroplastes non traités et en mesurant l'inhibition obtenue (IZAWA et GOOD, 1965). Cette méthode appelée *"chloroplast amount method"* a permi d'estimer le rapport existant entre le nombre de molécules "liées" au chloroplaste et la concentration en chlorophylle. Lorsque la préparation de chloroplastes est lavée par du tampon et centrifugée, une partie de l'activité photosynthétique est restaurée en partie ou en totalité (MORELAND et HILL, 1962 - VAN RENSEN, 1971) : MORELAND (1969) en déduit que les forces liant l'inhibiteur à une fraction chloroplastique sont faibles, du type forces de Van der Waals ou des liaisons hydrogène.

L'estimation du nombre de molécules "liées" au chloroplaste semble montrer une corrélation avec leur pouvoir inhibiteur : des valeurs de une molécule pour quelques centaines de molécules de chlorophylle ont été avancées en particulier dans le cas de la DCMU (WESSELS et VAN DER VEEN, 1956 - GOOD, 1961), ce qui suggère une certaine corrélation avec l'unité photosynthétique (300-500 molécules de chlorophylle). Les valeurs proposées par IZAWA et GOOD (1:2500) sont vraisemblablement surestimées, des liaisons non spécifiques pouvant se former sans qu'aucun traitement cinétique ne puisse lever cette ambigüité (CHENIAE et MARTIN 1968). A cet égard, TISCHER et STROTMAN (1977) semblent être parvenus à éviter cet écueil en utilisant des inhibiteurs radioactifs et en étudiant la compétition de ceux-ci avec d'autres inhibiteurs non marqués (STROTMAN et al, 1974). En effet, les valeurs de constantes de liaison K et d'inhibition K_i sont en excellente corrélation, un traitement des résultats par la représentation graphique de Lineweaver-Burke permettant d'éliminer dans certains cas la part apparemment non spécifique de la fraction liée au chloroplaste.
Nous avons donc choisi de reprendre ces études de compétition entre un inhibiteur de "type-DCMU" et les autres molécules interférant avec le transport d'électrons photosynthétique ; toutefois, nous nous limiterons à l'aspect qualitatif de la compétition, ne voulant pas accorder une importance trop grande aux constantes de liaisons trouvées, compte-tenu de la méconnaissance du degré de liaison non spécifique pouvant être observé aux hautes concentrations en inhibiteur.

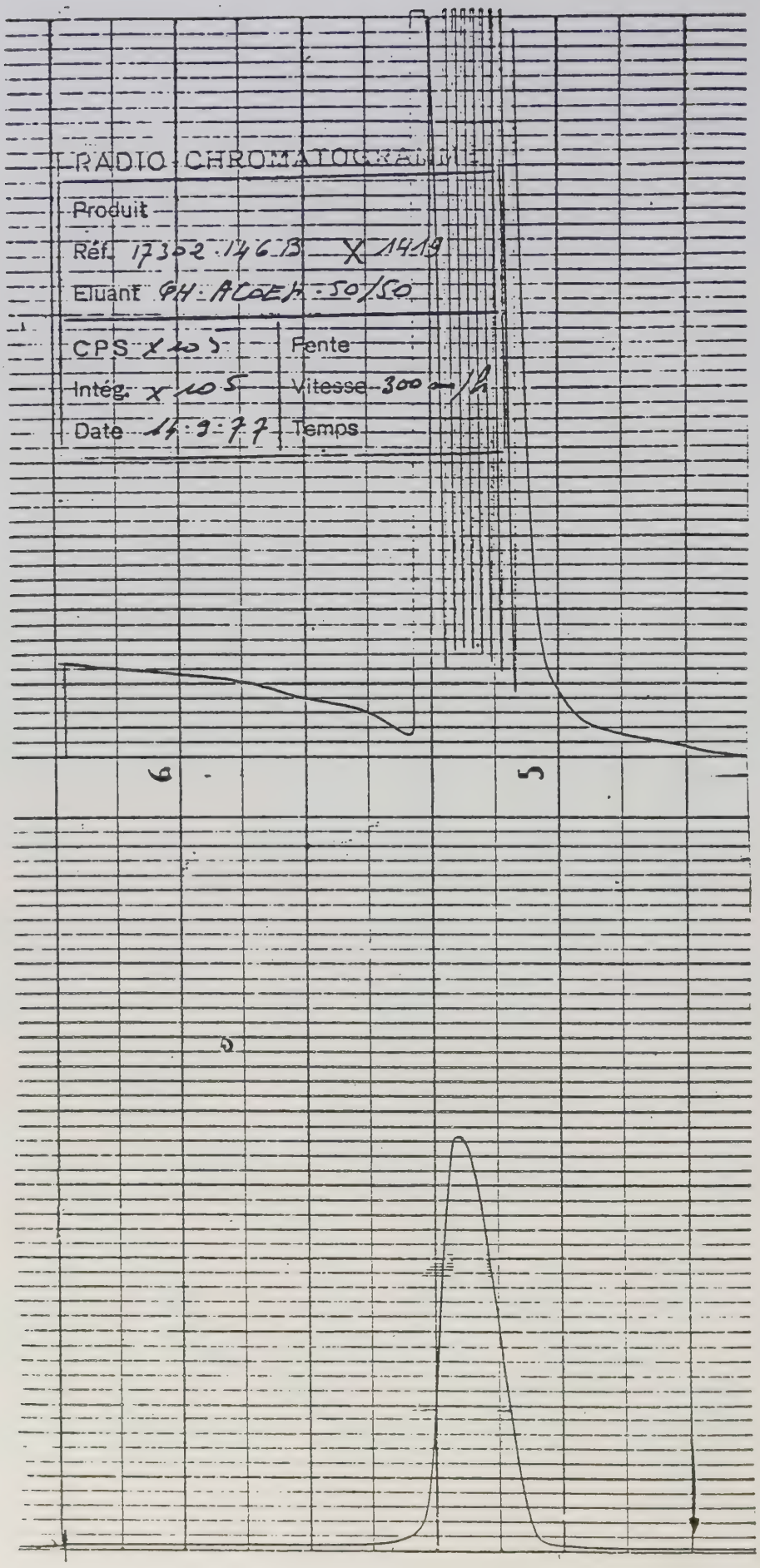


FIGURE 67 - Enregistrement de la radioactivité d'une chromatographie sur couche mince révélant la tache correspondante à l'atrazine ^{14}C *(solvant de développement hexane-acétone 7:1 - radioactivité détectée par un scanner BERTHOD LB 2711)*

2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les chloroplastes de pois obtenus en chambres climatiques (voir chapitre II-1ère partie) sont broyés dans un mélange réactionnel constitué de saccharose 0,3 M et du pyrophosphate de sodium 10 mM - pH 7,8. Après lavage avec le milieu d'extraction, les chloroplastes sont remis en suspension dans une solution constituée de saccharose 70 mM, du tampon tricine 2 mM, pH 7,8 et de l'EDTA 0,75 mM, pH 8,0 - ce traitement devant assurer la perforation des thylacoïdes et le découplage des phosphorylations (Mc CARTY 1971, TISCHER et STROTMAN, 1977). Après centrifugation, le culot est repris par une solution contenant 70 mM de saccharose, 1 mM $Mg\ Cl_2$ et 2 mM de tampon Tricine - pH 7,8.

Le milieu réactionnel est constitué de :

- Tampon tricine ..... 25 mM , pH 8,0
- Na Cl ..... 50 mM
- $Mg\ Cl_2$ ..... 5 mM
- Chloroplastes, équivalents à 50 γ / chlorophylle / ml

L'inhibiteur marqué est de l'atrazine ^{14}C; d'une activité spécifique de 27,8 μCi /mg. Le produit radioactif est toutefois dilué avec de l'atrazine "froide" afin d'obtenir une activité spécifique permettant des estimations correctes de radioactivité tout en permettant d'atteindre des molarités relativement élevées. Bien que l'atrazine soit dissoute dans de l'éthanol, les dilutions sont effectuées dans l'eau, afin d'éviter l'obtention de concentrations trop élevées en solvant dans le milieu réactionnel.

La pureté radiochimique de l'atrazine ^{14}C est contrôlée par chromatographie sur couche mince développée dans un mélange hexane/acétone (7:1) et la radioactivité enregistrée avec un SCANNER BERTHOLD LB 2711 (Figure 67).

Les inhibiteurs de photosynthèse en solution éthanolique sont, dans la mesure du possible, dilués dans l'eau pour atteindre la concentration finale désirée.

L'essai consiste à placer un aliquot de suspension chloroplastique dans le milieu réactionnel en présence de concentrations croissantes en atrazine ^{14}C après avoir vérifié - sur un aliquot - le découplage de phosphorylation par addition de méthylamine. La suspension est agitée vigoureusement et centrifugée à 10000 g pendant 10 minutes. La radioactivité du surnageant est comptée dans du mélange scintillant READY-SOLV GP (BECKMAN), les dpm calculées après correction de quenching et les concentrations en inhibiteur déterminées. Un protocole identique est suivi en ajoutant une concentration unique de chaque inhibiteur de photosynthèse. La quantité d'inhibiteur libre correspond à la radioactivité retrouvée dans le surnageant, tandis que la concentration en inhibiteur lié est calculée par différence entre la radioactivité apportée avant addition des chloroplastes et celle équivalente à la quantité d'inhibiteur libre. Les valeurs sont ramenées à l'unité pondérale de chlorophylle (mg).

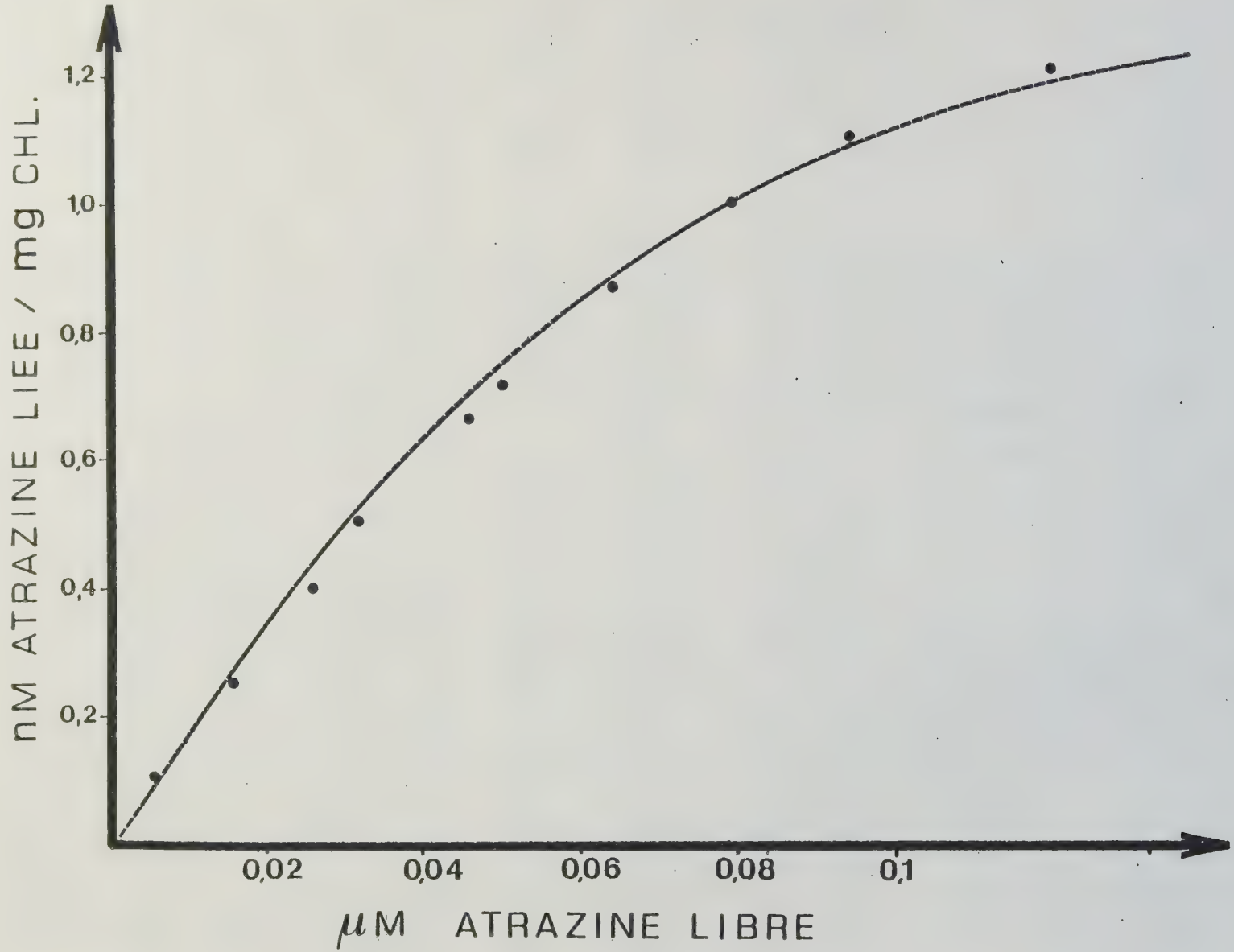


FIGURE 68 -Relation entre les concentrations en Atrazine ^{14}C libre et liée aux chloroplastes découplés extraits de pois.

3 - RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les concentrations en atrazine ^{14}C liée au chloroplaste varient dans nos essais de 0,3 à 2 nanomoles/mg chlorophylle, tandis que les teneurs correspondantes en atrazine ^{14}C libre sont de l'ordre de 25 à 400 nanomoles. La courbe reliant une série de valeurs, comprise entre 0,1 et 1,2 nanomoles d'atrazine ^{14}C fixée, est représentée sur la figure 68. En présence de 1 micromole de DCMU, la quantité d'atrazine fixée sur le chloroplaste est très inférieure, comparée au témoin représenté par l'atrazine seule (figure 69).

La transformation en droite des valeurs obtenues par la représentation de Lineweaver Burke, en l'absence (témoin) et en présence de 1 µmole de DCMU et Lénacile, de 10 µmoles de pyramine, propanil et RU 21731 et de 100 µmoles de barbane, est présentée sur la figure 70). Cette dernière montre que tous les inhibiteurs testés entrent en compétition avec l'atrazine en ce qui concerne leur liaison avec une fraction chloroplastique.

Les droites obtenues avec les différents inhibiteurs et celle du témoin présentent un point d'intersection avec l'axe des ordonnées pratiquement commun, aux erreurs expérimentales près : cette observation suggère que le nombre de sites de liaison avec le chloroplaste reste relativement constant pour tous les produits (d'un ordre de grandeur de 3 nanomoles par mg de chlorophylle). Les pentes différentes des droites représentées sur la figure 70 indiquent des affinités variables des inhibiteurs pour le site de liaison.

La trifluraline, le nitrofène (0,1 mM) et l'ioxynil (1 µM) sont placés en compétition avec l'atrazine ^{14}C selon le même protocole. En effectuant la représentation graphique de Lineweaver-Burke, un ensemble droite est obtenu et représenté sur la figure 71. La trifluraline et le nitrofène présentent les caractéristiques d'une liaison non compétitive avec le chloroplaste vis-à-vis de l'atrazine, tandis que l'ioxynil se comporte comme un inhibiteur entrant en compétition avec l'atrazine ; toutefois, la pente de la droite correspondant à ce produit semble indiquer une compétition moins forte que celle obtenue avec DCMU, les deux composés d'une puissance inhibitrice pratiquement identique vis-à-vis de la réaction de Hill, étant appliqués à une concentration similaire (1 µmole). Dans un travail précédent, il en avait été déduit que l'ioxynil pouvait se lier de manière non compétitive, comparé à DCMU, à une fraction chloroplastique (VAN ASSCHE, 1979). De plus, le nombre de sites de liaison semble légèrement différer de celui des inhibiteurs de "type-DCMU". En fait, les anomalies trouvées avec l'ioxynil, dans les études de compétition, sont vraisemblablement le reflet de la dualité de sites d'action suggérée précédemment : une certaine liaison existe toutefois avec le site DCMU, rendant compte de la compétition observée sur la figure 71.

A partir des résultats représentés sur les figures 70 et 71, il apparait clairement que l'on puisse classer les inhibiteurs de photosynthèse étudiés dans ce travail en 2 groupes :

- Liaison compétitive avec un site chloroplastique : *N-phénylurées, N-phénylcarbamates, N-acylanilides, s-triazines, pyridazinones, uraciles, 1,2,4-thiadiazoles* et *hydroxybenzonitriles halogénés.*

- Liaison non compétitive entre un inhibiteur de "type-DCMU" et un produit des familles suivantes : *dinitroanilines* et *diphényléthers.*

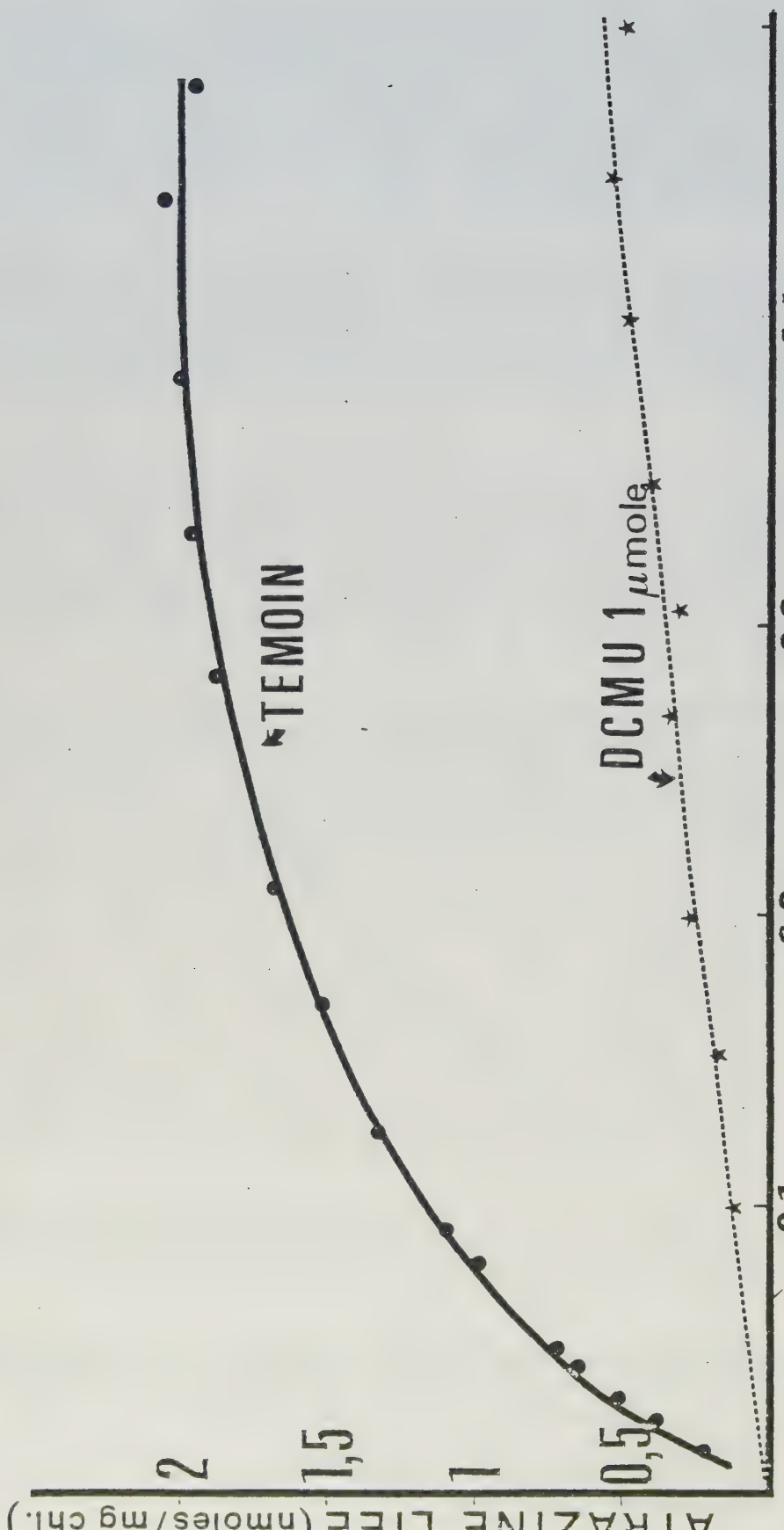


FIGURE 69 - Relation entre les concentrations en Atrazine ^{14}C libre ou liée aux chloroplastes découplés extraits de pois en l'absence ou en présence de 1 µmole de DCMU.

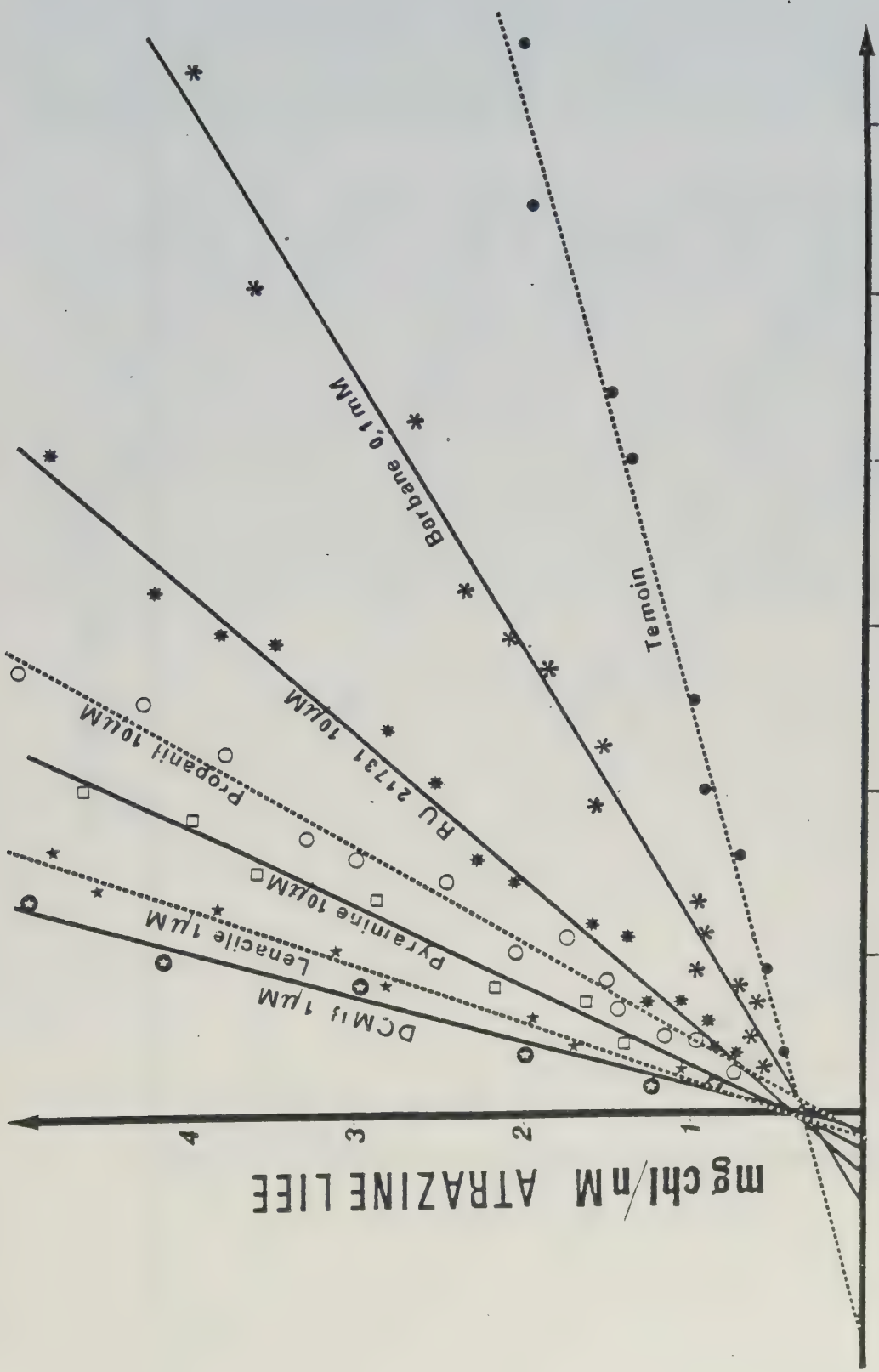


FIGURE 70 - Etudes de compétition entre l'Atrazine ^{14}C et différents inhibiteurs de photosynthèse par la méthode des ordonnées inverses.

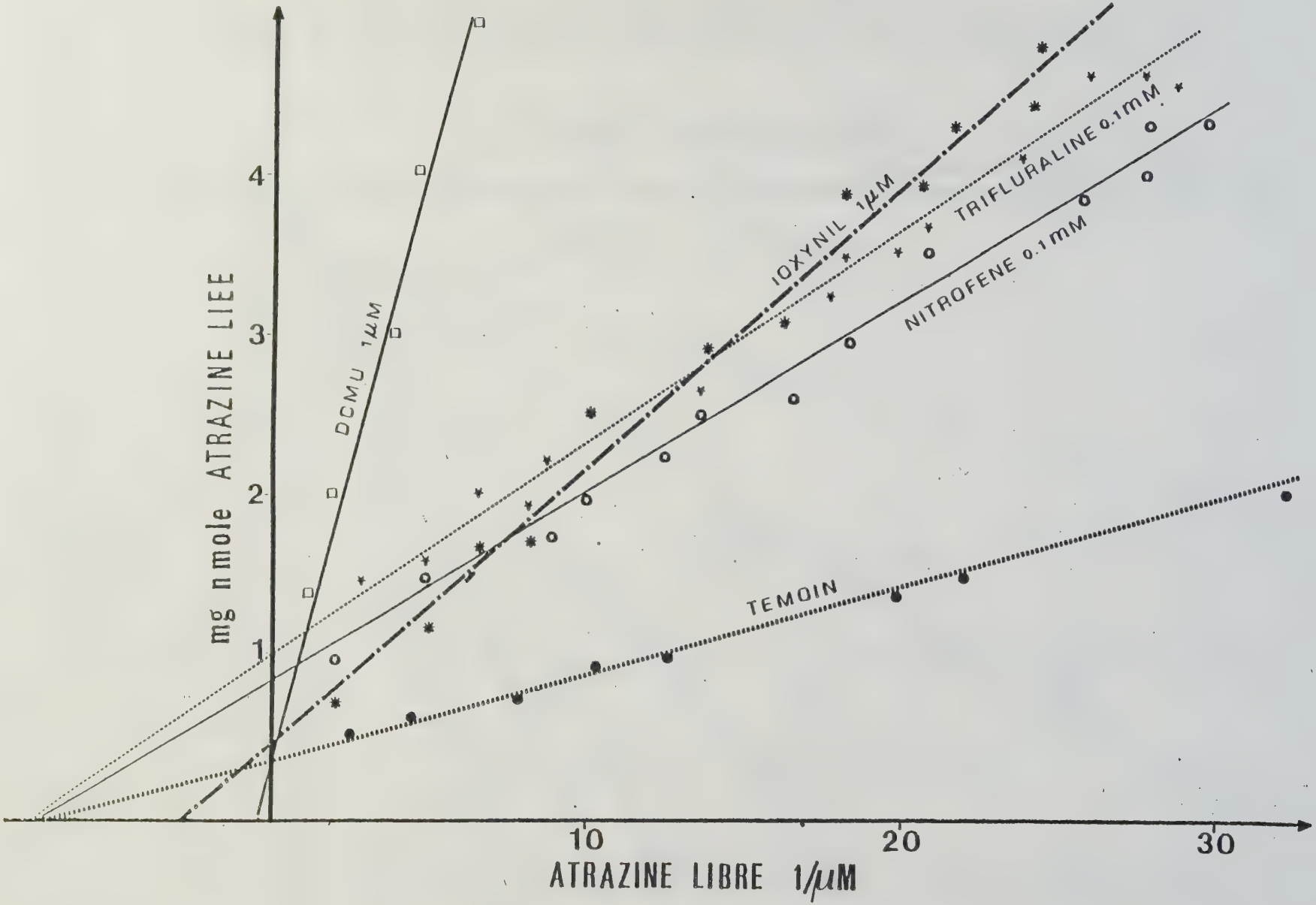


FIGURE 71 - Liaisons compétitive avec le chloroplaste entre Atrazine et Ioxynil, et non compétitive, avec le nitrofène et la trifluraline, mises en évidence par la méthode des ordonnées inverses.

Ces groupes correspondent aux 2 classes de produits mentionnées dans ce travail, à savoir : inhibiteurs de "type-DCMU" et site d'action différent ; les études de compétition apportent donc une preuve supplémentaire de l'identité du site d'action pour les inhibiteurs de "type-DCMU" ; toutefois, l'*Ioxynil* constitue encore une fois un cas particulier puisque nous avions suggéré que ce composé pouvait présenter un double site d'action (au niveau de B et du côté oxydant du PS II) : il est possible d'interpréter la droite obtenue avec l'*Ioxynil* (figure 71) en termes d'un site d'action sur lequel une compétition devrait s'exercer (site - DCMU) et un 2ème site pour lequel une compétition ne doit pas théoriquement être observée (côté oxydant du PS II).

Nous ne sommes pas attachés à rechercher pour chaque inhibiteur une relation entre les constantes de liaison (K) et les constantes d'inhibition (K_i). Ces dernières valeurs sont obtenues par TISCHER et STROTMAN (1977), qui utilisent une méthode de calcul basée notamment sur la concentration en inhibiteur libre (quantité présente dans le surnageant après centrifugation de la suspension chloroplastique) : ceci implique que la fraction liée au chloroplaste le soit sous forme d'une liaison spécifique au site d'action. Ce point n'est pas démontré dans la mesure où l'excellente concordance trouvée par ces auteurs entre K et K_i repose sur un calcul basé sur une valeur expérimentale commune, ne rendant pas compte de la part éventuelle imputable à des liaisons non spécifiques. En conséquence, nous n'avons pas voulu donner une importance particulière à la détermination de ces constantes qui peuvent ne représenter qu'une valeur artéfactuelle. Par contre, la démonstration d'une compétition vers un même site pour les inhibiteurs de "type-DCMU" nous a semblé une méthode simple et valable permettant d'apporter une preuve supplémentaire à l'existence d'un site d'action unique.

CHAPITRE VI

PERTE DE SENSIBILITÉ DES CHLOROPLASTES TRAITÉS À LA TRYPSINE, AUX INHIBITEURS DE "TYPE-DCMU"

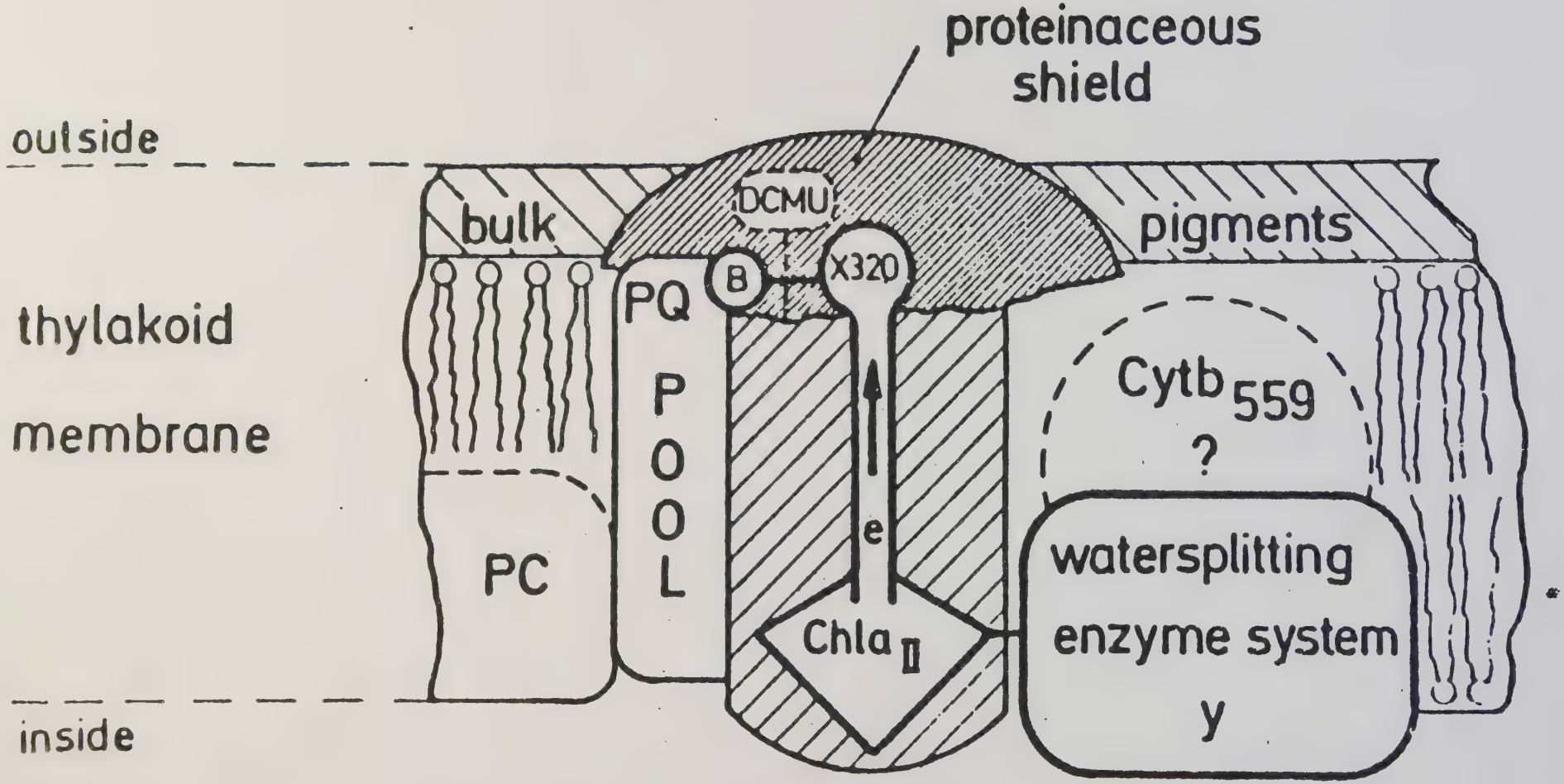


FIGURE 72 - Schéma de l'organisation structurale et fonctionnelle du PS II (RENGER - 1976).

1 - INTRODUCTION

Dans ce travail, nous nous sommes déjà référés à l'existence de 3 types de plastoquinones fonctionnelles (Q, B et PQ) pouvant être liées à une protéine. Toutefois, ni la nature de l'association PQ-protéine, ni même l'existence d'une telle association n'a été démontrée.

L'utilisation d'une enzyme protéolytique a offert à cet égard certaines possibilités : le traitement de chloroplastes par la trypsine provoque une inhibition du transport d'électrons plus ou moins marquée en fonction des conditions expérimentales (MANTAI 1970, SELMAN et al 1973, DÖRING 1976, SOFROVA et al 1976). Un traitement ménagé avec cette enzyme suggère à RENGER (1976) que l'accepteur primaire d'électrons du PS II est recouvert d'un constituant protéinique sensible à la digestion tryptique. Un schéma simplifié de l'organisation structurale et fonctionnelle du PS II est proposé (figure 72). Un certain nombre d'arguments est fourni suggérant que la trypsine attaque le PS II sur un site très près du centre réactionnel, du côté oxydant ou du côté réducteur, ce dernier site semblant le plus probable (RENGER et al, 1976).
La perte de sensibilité, après digestion à la trypsine, à la DCMU, est également observée sur des particules PS II isolées à partir de chloroplastes (CROZE et al, 1979). L'observation de cette perte de sensibilité à l'inhibiteur peut toutefois être interprétée de deux façons : la protéine membranaire recouvrant Q peut être responsable de la liaison de DCMU avec le chloroplaste et agir comme médiateur entre l'inhibiteur et le complexe PQ ; une autre explication serait que la digestion à la trypsine rend beaucoup plus accessible Q à des accepteurs d'électrons exogènes (ferricyanure par exemple) (VAN RENSEN et KRAMER, 1979). Actuellement, aucun résultat expérimental ne permet de lever cette ambiguïté. Toutefois, il peut être intéressant d'évaluer dans quelle mesure les inhibiteurs de photosynthèse perdent leur activité, comme c'est le cas pour DCMU, lorsque les chloroplastes ont été traités de façon ménagée par la trypsine.

2 - MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les chloroplastes dépourvus de leur enveloppe sont extraits à partir de feuilles de pois selon une méthode dérivée de celle de WINGET et al (1965). Les feuilles sont broyées pendant 5 secondes dans un mélange contenant 0,3 mM Na Cl, 1 mM $Mg Cl_2$, 1 mM EDTA et du tampon TES 0,04 M - pH 7,3. Le broyat est filtré sur tissus Miracloth et le filtrat centrifugé pendant 5 minutes à 2000 g. Le culot est lavé deux fois par une solution contenant :

- Saccharose ..... 0,2 M
- Na Cl ..... 0,01 M
- $Mg Cl_2$ ..... 1,5 mM
- Tampon Tricine ..... 0,05 M - pH 7,3

Le culot est repris dans le même milieu ; la concentration en chlorophylle est déterminée selon la méthode d'ARNON (1949). Le milieu réactionnel est identique seul le ferricyanure de K est ajouté (2 mmoles).

Les essais de mesure de la réaction de Hill en présence de ferricyanure sont effectués selon le protocole décrit dans le Chapitre II en utilisant la méthode automatisée ; le montage est toutefois légèrement modifié (figure 73) dans le but de pré-incuber la suspension de chloroplaste avec la trypsine : à cet effet,

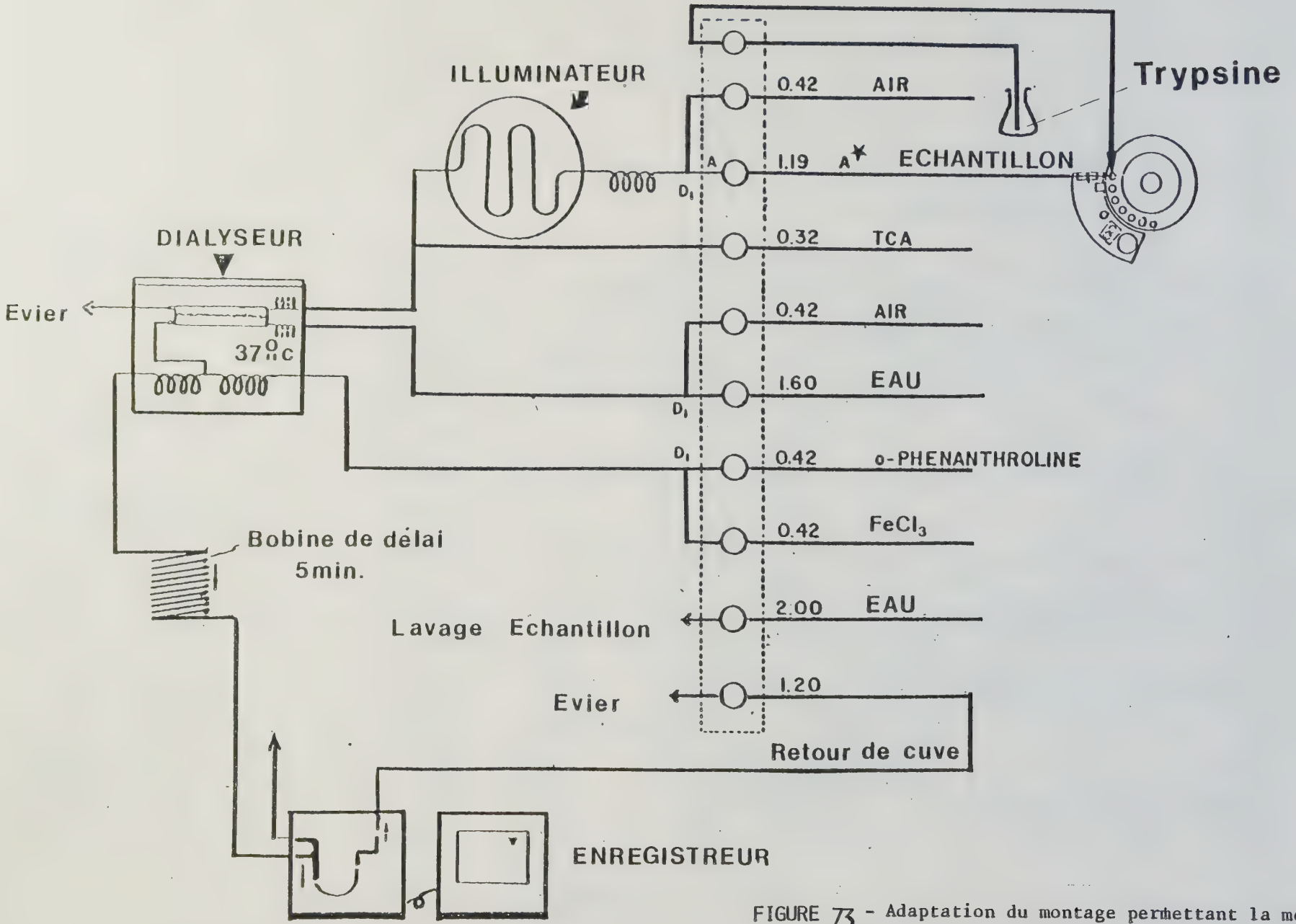


FIGURE 73 - Adaptation du montage permettant la mesure automatisée de la réaction de HILL à la pré-incubation des chloroplastes en présence de trypsine. Le diagramme et les débits indiqués sont similaires à ceux présentés dans le Chapitre II - 1ère Partie ; seule la trypsine est ajoutée en proportions indiquées dans le texte.

un tube de pompe, dont le diamètre varie en fonction de la quantité d'enzymes désirée, aspire la solution de trypsine qui est ensuite amenée dans la cuvette contenant les chloroplastes, avant d'être aspirée. La réaction de Hill est ensuite mesurée automatiquement. Ainsi, en calculant convenablement le diamètre de ce tube de pompe, la concentration en trypsine de la solution-mère, la cadence de prélèvement des échantillons et le nombre de cuvettes précédant l'échantillon analysé, est-il possible de faire varier la concentration en trypsine et le temps d'incubation avec la suspension de chloroplastes.

Dans le cas de mesures de la fluorescence en lumière continue, les chloroplastes sont placés directement dans la cuvette de mesure en présence de trypsine à la concentration voulue, et laissés à pré-incuber durant une période déterminée ; la mesure est ensuite réalisée directement sur cette suspension.

3 - Résultats et Discussion

Dans un premier temps, nous avons recherché les conditions optimales d'essai, notamment la concentration en trypsine par rapport à la quantité de chloroplastes, et la durée d'incubation. Lorsque les chloroplastes sont incubés pendant 4 minutes en présence de 10 γ trypsine/ml, on observe pratiquement un doublement de l'activité photoréductrice en présence de ferricyanure : (activité spécifique : témoin 250 µmoles de ferricyanure réduit/mg chlorophylle/heure, traité : 450 µmoles/mg chlorophylle/heure). Ce résultat indique que l'effet "découplant" observé proviendrait de l'attaque du facteur de couplage CF_1 (NELSON et al, 1972), constitué d'une protéine localisée en partie sur la face externe de la membrane photosynthétique.
Après une série d'essais préalables, une pré-incubation des chloroplastes durant 8 minutes avec 20 γ de trypsine par ml (120 γ chlorophylle/ml) a été choisie. Dans ces conditions, l'activité inhibitrice avant et après digestion à la trypsine a été mesurée pour les différents inhibiteurs de photosynthèse. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux 18 et 19. En règle générale, le pré-traitement des chloroplastes par la trypsine provoque une chute d'activité photoréductrice d'environ 50 %. L'observation la plus importante est que ce même traitement restaure en grande partie l'activité photoréductrice pour la *DCMU, l'Atrazine, le Propanil, le Barbane, le Lénacil, la Pyramine, le Métribuzin et le RU 21731 ;* ce résultat est particulièrement mis en évidence lorsque les taux de réduction du ferricyanure en présence des inhibiteurs sont comparés au "témoin trypsine" (3ème colonne des tableaux 18 et 19). Par contre, la digestion ménagée de la suspension de chloroplastes à la trypsine ne restaure pas de façon substantielle l'activité photoréductrice de ceux-ci lorsqu'ils sont placés en présence d'*Ioxynil*, de *Nitrofène* et de *Trifluraline*.
Une observation identique a été faite par PALLETT et DODGE (1979) pour l'Ioxynil tandis que l'inhibition était levée par le traitement à la trypsine dans le cas du bromacile *(uracile)*, du métribuzin *(triazinone)* et du monuron *(phényl-urée)*.
Les mesures d'induction de fluorescence en lumière continue, effectuées sur une suspension de chloroplastes avant et après pré-traitement à la trypsine, sont faites dans les conditions suivantes :

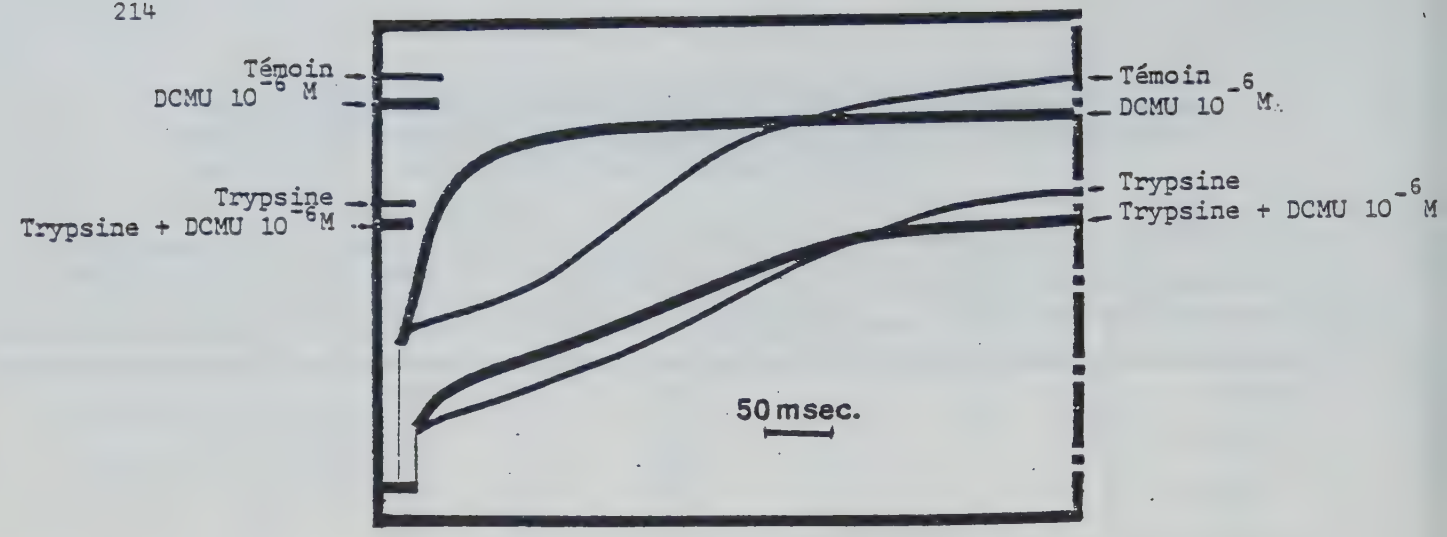
- milieu réactionnel : identique à celui utilisé pour la photoréduction du ferricyanure de K, seul ce dernier est omis
- 20 γ de trypsine/ml
- temps d'incubation : 6 minutes
- 50 γ chlorophylle/ml

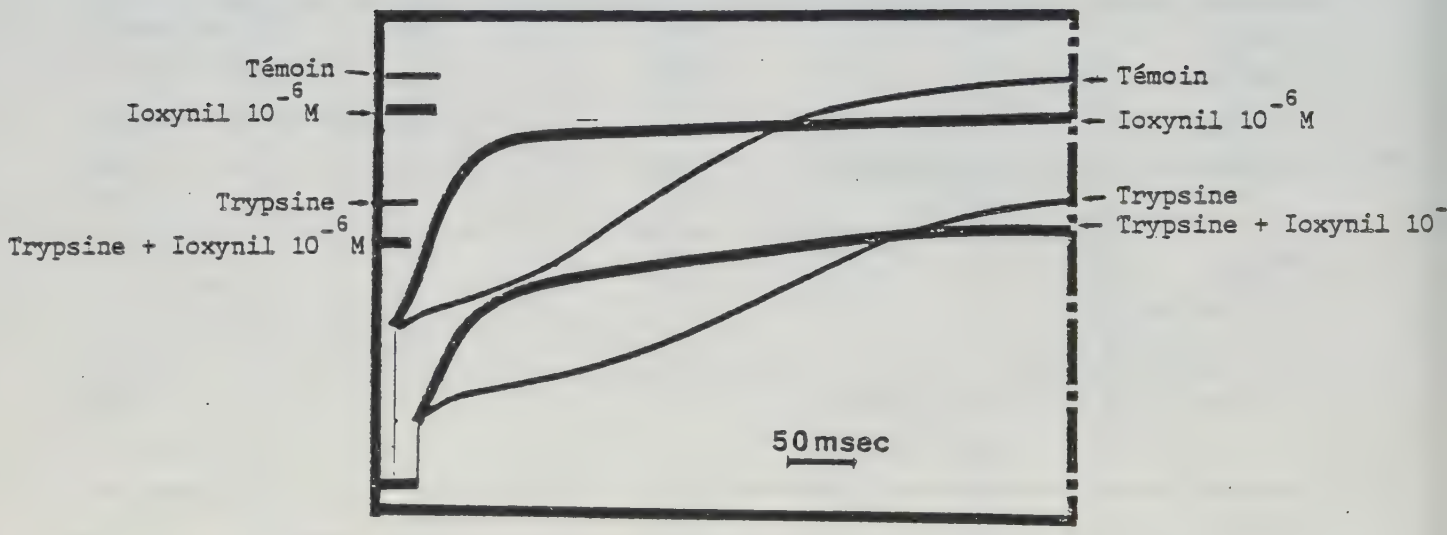
TABLEAU 18 - Effets des inhibiteurs sur la réaction de Hill mesurée sur chloroplastes dépourvus de leur enveloppe avant et après digestion à la trypsine

Additions à la suspension de chloroplastes (120 γ/ml)	Activité spécifique (µmoles Fe^{+++} réduit / mg Chl / h)	% Activité par rapport au Témoin	% Activité par rapport au témoin "Trypsine"
Témoin	252	100	-
Chloroplastes + DCMU 10^{-6}M	63	25	-
Chloroplastes + trypsine	126	50	100
Chloroplastes + trypsine + DCMU	113	45	90
Témoin	260	100	-
+ Atrazine 10^{-5}	42	16	-
+ trypsine 20 γ/ml	135	52	100
+ trypsine + Atrazine 10^{-5}M	123	47	91
Témoin	248	100	-
+ Propanil 10^{-5}M	39	15	-
+ trypsine 20 γ/ml	144	58	100
+ trypsine + Propanil 10^{-5}M	132	53	92
Témoin	215	100	-
+ barbane 10^{-4}M	86	40	-
+ trypsine 20 γ/ml	105	49	100
+ trypsine + barbane 10^{-4}M	99	46	94
Témoin	238	100	-
+ Ioxynil 10^{-6}M	59	24	-
+ trypsine 20 γ/ml	131	55	100
+ trypsine 20 γ/ml + Ioxynil 10^{-6}M	65	27	49
Témoin	245	100	-
+ Lénacile 10^{-6}M	61	25	
+ trypsine 20 γ/ml	134	54	100
+ trypsine 20 γ/ml + Lénacile 10^{-6}M	121	49	90

TABLEAU 19 - Effets des inhibiteurs sur la réaction de Hill mesurée sur chloroplastes dépourvus de leur enveloppe avant et après digestion à la trypsine

Additions à la suspension de chloroplastes (120 γ/ml)	Activité spécifique (µmoles Fe^{+++} réduit / mg Chl / h)	% Activité par rapport au Témoin	% Activité par rapport au témoin "Trypsine"
Témoin	262	100	-
+ Pyramine 10^{-5}M	94	36	-
+ trypsine 20 γ/ml	133	51	100
+ trypsine 20 γ/ml + Pyramine 10^{-5}M	127	48	95
Témoin	235	100	-
+ Métribuzin 10^{-6}M	58	24	-
+ trypsine 20 γ/ml	112	48	100
+ trypsine 20 γ/ml + Métribuzin 10^{-6}M	99	42	88
Témoin	250	100	-
+ Nitrofène 10^{-4}M	100	40	-
+ trypsine 20 γ/ml	140	56	100
+ trypsine 20 γ/ml + Nitrofène 10^{-4}M	53	21	38
Témoin	260	100	
+ RU 21731 10^{-5}M	52	20	-
+ trypsine 20 γ/ml	133	51	100
+ trypsine 20 γ/ml + RU 21731 10^{-5}M	119	46	89
Témoin	220	100	-
+ Trifluraline 10^{-4}M	77	35	-
+ trypsine 20 γ/ml	115	52	100
+ trypsine 20 γ/ml + Trifluraline 10^{-4}M	39	17	33





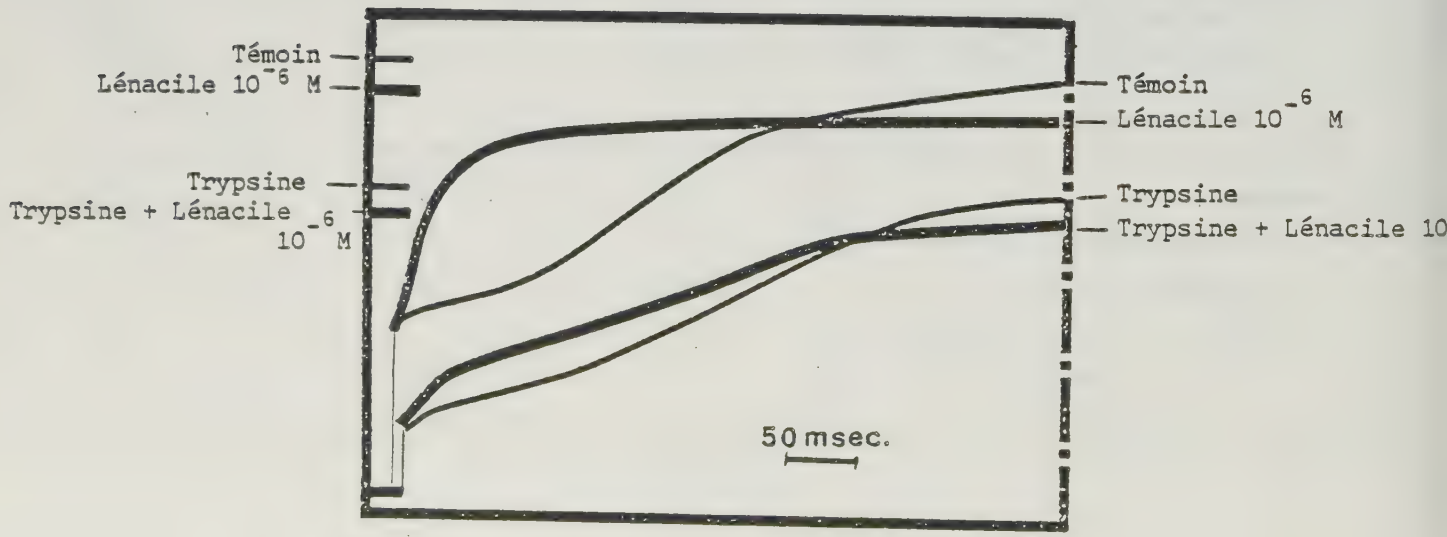


FIGURE 74 - Cinétiques d'induction de fluorescence obtenues sur une suspension de chloroplastes traités et non traités à la trypsine, en présence et en absence d'inhibiteurs *(30 γ chlorophylle/ml, 5 γ trypsine/ml, énergie d'excitation 85 µ Einstein/m2/sec, vitesse de balayage de l'oscilloscope 50 millisecondes/division)*

Après la période d'incubation, la mesure est effectuée ; certains enregistrements d'inhibiteurs de "type-DCMU" sont présentés sur la figure 74).
Bien que le traitement à la trypsine diminue fortement le niveau de fluorescence stationnaire, une grande partie de l'inhibition est levée par cette incubation, comme en témoignent les allures et les vitesses des courbes de fluorescence et les niveaux des valeurs transitoires OI.

Ces résultats militent pour l'hypothèse de l'existence d'une protéïne recouvrant le complexe QB puisque la sensibilité des chloroplastes aux inhibiteurs de "type-DCMU" est très largement perdue lorsque ceux-ci ont été traités par la trypsine, alors que les molécules dont le site d'action ne se situe pas au niveau du complexe d'accepteurs QB (nitrofène, trifluraline, et dans une certaine mesure, Ioxynil) continuent à bloquer le transport d'électrons lorsque le ferricyanure de K est accepteur après digestion avec l'enzyme protéolytique. En corollaire, ces observations tendraient à suggérer que la trypsine ne rend pas Q plus accessible aux accepteurs de la réaction de Hill.

L'existence d'une protéïne-écran avec laquelle les inhibiteurs de photosynthèse pouvant se lier de façon réversible a suggéré à TREBST et DRABER(1979) la présence d'un site "d'ancrage" des inhibiteurs de photosynthèse selon un schéma présenté sur la figure 75. En fonction de la structure des molécules étudiées, les sites de liaisons avec cette protéïne varient, mais la conséquence de la liaison serait un changement conformationnel résultant en un blocage du transport d'électrons entre Q et B. A cet image quelque peu idéalisée, PFISTER et ARNZEN (1979) préfèrent substituer un schéma selon lequel les accepteurs d'électrons du PS II forment un complexe avec des protéïnes, l'ensemble constituant une organisation spatiale apparemment moins structurée (figure 76).

Il est intéressant de constater que lorsque les chloroplastes ont été traités par la trypsine, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, révèle 3 bandes à partir de la fraction polypeptidique solubilisée au SDS, dont les PM sont de 17, 27 et 32 K daltons, respectivement, (CROZE et al, 1979). Par ailleurs, en utilisant des biotypes de chénopodes résistants et sensibles aux triazines, PFISTER et ARNTZEN (1979) montrent que la résistance à ces herbicides est liée au chloroplaste lui-même ; en analysant sur gel de polyacrylamine la composition en polypeptides des extraits chloroplastiques des deux biotypes, les auteurs montrent qu'une altération apparaît dans les chloroplastes "résistants" à l'atrazine, dans la région de 32Kdaltons, et que cette fraction pourrait correspondre à l'apoprotéïne du complexe B, en se référant à des travaux mettant en évidence l'élimination sélective par la trypsine de polypeptides localisées à la surface du thylacoïde (TISCHER et STROTMAN, 1979, STEINBACK,1980).Le poids moléculaire de cette apoprotéïne (32 Kdaltons) est à rapprocher de celui trouvé par CROZE et al (1979) après digestion à la trypsine (32 Kdaltons).

Les chloroplastes résistants à l'atrazine restant sensibles aux autres inhibiteurs de "type-DCMU", PFISTER et ARNTZEN (1979) estiment qu'il existe des sites de reconnaissance différents pour les différents produits, l'altération possible des sites de liaison dans les chloroplastes résistants pouvant provenir d'une variation dans une séquence de quelques amino-acides seulement. Un modèle de sites de liaison pour les inhibiteurs du PS II est proposé (Figure 77).

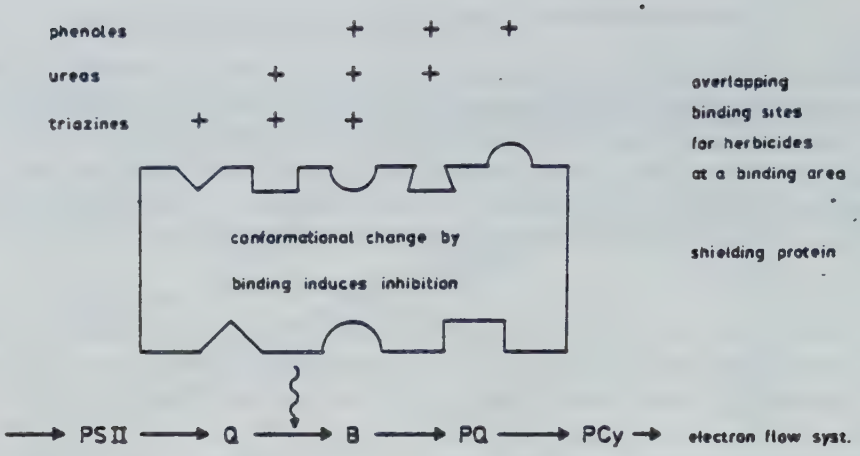


FIGURE 75 - Représentation schématique des sites de liaison des herbicides avec une protéïne catalysant le flux d'électrons entre PS II et PQ (TREBST et DRABER, 1978).

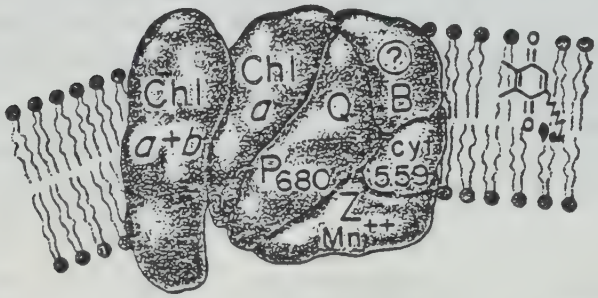


FIGURE 76 - Schéma de l'organisation structurale du complexe PS II (PFISTER et ARNTZEN, 1979)

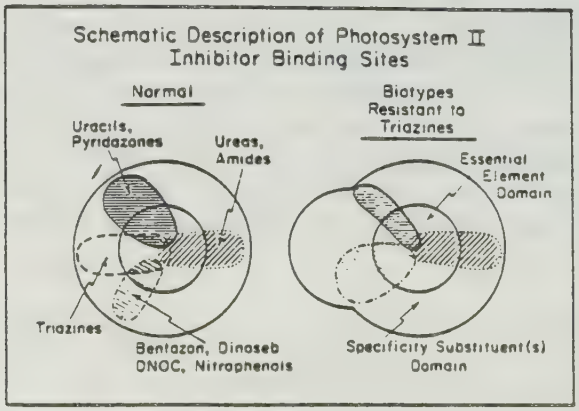


FIGURE 77 - Modèle des sites de liaisons des inhibiteurs du PS II (PFISTER et ARNTZEN, 1979)

CONCLUSION GÉNÉRALE et PERSPECTIVES

Le problème de l'intéraction inhibiteur-cible

Chaque chapitre de ce mémoire a fait l'objet d'une discussion qui lui était propre, en conséquence il semble inutile, sous peine de redites, de reprendre en détail les observations faites à partir des résultats obtenus et leur interprétation.

Toutefois, les éléments acquis au cours des différentes expérimentations réalisées doivent être rassemblés, afin de mesurer le chemin parcouru et celui restant à faire pour obtenir une image plus cohérente de l'action des divers inhibiteurs sur l'appareil photosynthétique.

L'étude des intéractions avec les photoréactions a montré que le terme "inhibiteur de photosynthèse" ou "inhibiteur de la réaction de Hill" était d'une précision insuffisante. En effet, si tous les produits étudiés s'avèrent être inhibiteurs de cette dernière réaction, ce terme doit être modulé en fonction d'un effet possible sur les transports d'électrons cyclique et non cyclique, ainsi que sur les phosphorylations qui leur sont couplées. Nous avons montré que, par élimination, tous les inhibiteurs testés sont sans effet notable sur le transport d'électrons catalysé par le PS I, tandis que la photoréduction liée aux activités PS II et PS I - et mesurée en présence d'eau comme donneur d'électrons - est bloquée.

En ce qui concerne les photophosphorylations, on distingue 2 groupes de familles chimiques :

- *N-phénylurées, diphénylamines, s-triazines, triazinones, uraciles, urées cyclisées, éthers et pyridazinones :* les inhibiteurs de cette catégorie bloquent le transport d'électrons non cyclique mais sont sans effet sur la phosphorylation cyclique catalysée par le PMS, la phosphorylation non-cyclique couplée à la photoréduction de $NADP^+$ lorsque le DCPIP réduit est donneur d'électrons ; ces produits peuvent être considérés comme étant uniquement des inhibiteurs du transport d'électrons.

- *N-phénylcarbamates, N-acylanilides, hydroxybenzonitriles halogénées, 1,2,4-thiadiazoles* et *dinitroanilines :* les produits de ces familles inhibent non seulement le transport d'électrons non-cyclique, mais bloquent également la phosphorylation cyclique catalysée par le PMS et la phosphorylation non-cyclique couplée à la photoréduction du $NADP^+$ en présence de DCPIP réduit comme donneur d'électrons. En adoptant la classification proposée par MORELAND et HILTON (1976), ces molécules peuvent être considérées comme des inhibiteurs découplants.

Les éthers (phénoxypyridazines, diphényléthers) constituent cependant une exception, puis ces susbtances inhibent la phosphorylation non-cyclique couplée à la réduction du $NADP^+$ lorsque le DCPIP réduit est donneur d'électrons, tandis que la phosphorylation cyclique n'est pas perturbée : ces inhibiteurs constituent donc une catégorie intermédiaire entre celles évoquées ci-dessus.

Les effets découplants observés avec certains inhibiteurs de photosynthèse ne semblant pas représenter le mode d'action primaire responsable de la mort des adventices par les herbicides testés au cours de ce mémoire (voir les travaux de SOUZA-MACHADO et al - 1976 , sur les chloroplastes résistants à l'Atrazine), les recherches se sont orientées vers une meilleure connaissance de l'inhibition du transport d'électrons.

A cet égard, les résultats qualitatifs de mesures d'induction de fluorescence de la chlorophylle a, montrent que tous les inhibiteurs étudiés sont de type-DCMU, sauf les *diphényléthers, les phénoxypyridazines,* et les *2,4-dinitro-anilines,* aussi bien avec les chloroplastes qu'avec les algues unicellulaires. Sur un plan quantitatif, une bonne corrélation existe entre la concentration en inhibiteurs et les aires complémentaires totales de fluorescence A_{max}, normalisées à la ϕmax, valeurs étant proportionnelles au nombre de quanta utilisé par le PS II (MURATA et al, 1966) ou, en d'autres termes, la capacité de quenching photochimique du pool d'accepteurs du PS II (ETIENNE et al, 1974). Il faut cependant signaler que la taille de ces aires de complémentarité varie largement dans une gamme de concentrations voisines de la dose de demi-effet, mais ne change plus d'une manière aussi importante au-dessus d'une valeur-seuil : autant, dans le cas des chlorelles, la fluorescence maximale augmente avec la concentration en inhibiteurs de "type-DCMU", et ceci selon une proportionnalité relativement satisfaisante, autant les valeurs transitoires de fluorescence observées sur chloroplastes constituent un autre moyen quantitatif de mesure du degré de rupture entre A et Q, très bien corrélées aux inhibitions du dégagement d'O_2 en présence de ferricyanure de K par les substances d'un site d'action identique à la DCMU.

L'*ioxynil* constitue toutefois un cas particulier dans la mesure où les valeurs de demi-effet obtenues sur les aires de complémentarité, les niveaux de fluorescence maximale (sur chlorelles), et transitoire (sur chloroplastes) ne correspondent pas d'une façon satisfaisante aux inhibitions observées sur la réaction de Hill (dégagement de O_2 ou réduction du ferricyanure). Ces résultats suggèrent que cet inhibiteur peut présenter une dualité de sites d'action.

Toutes les études de l'induction de fluorescence en lumière continue fournissent une évaluation qualitative et quantitative de l'état redox de Q dont la réoxydation par le pool de PQ est inhibée par les inhibiteurs de "type-DCMU". Toutefois, la fluorescence variable de la chlorophylle a_{II} est contrôlée non seulement par l'état redox du donneur primaire d'électrons au PS II (BUTLER, 1972), mais aussi par celui de Q et d'un accepteur secondaire B (BOUGES-BOCQUET, 1973). Cette hypothèse prend toute son importance dans le cas qui nous préoccupe - celui des inhibiteurs de "type-DCMU" - depuis que VELTHUYS et AMESZ (1974) ont montré que la DCMU déplaçait le potentiel rédox de B vers une valeur plus électronégative, bloquant ainsi la réoxydation de Q^- par B (ou R). Deux méthodes permettent d'évaluer la recombinaison de charges provoquée par ce changement de potentiel : la première consiste à mesurer l'augmentation de la fluorescence initiale ϕ_0 de chloroplastes dont le côté donneur du PS II a été détruit par l'hydroxylamine : une relation quantitative est ainsi démontrée entre la concentration en inhibiteur et l'augmentation de ϕ_0, les valeurs de demi-effet obtenues sur cette mesure correspondant assez bien à celles observées sur la réaction de Hill. Le déplacement de l'équilibre rédox du complexe QB est ainsi déterminé :

$$QB^- \xrightleftharpoons[\text{inhibiteurs de "type-DCMU"}]{} Q^- B$$

La 2ème méthode consiste à mesurer la luminescence déclenchée par les inhibiteurs de "type-DCMU" sur des algues adaptées à l'obscurité, luminescence provenant de la recombinaison d'une charge négative portée par B^- et d'une charge positive provenant d'un état S, stables à l'obscurité et selon l'équation

$$S_n \text{ Chl } QB^- + \text{inhibiteurs "type-DCMU"} \longrightarrow S_n \text{ Chl } Q^-B$$

$$S_n \text{ Chl } Q^-B \longrightarrow S_0 \text{ Chl } QB + h\nu$$

Une relation quantitative existe entre la concentration en inhibiteurs de "type-DCMU" et les amplitudes du pic initial de luminescence, ainsi que la quantité totale de lumière émise reflétée par l'intégrale de luminescence :

$$\Sigma L = \int L dt$$

Ces 2 techniques mettent l'accent sur deux anomalies : le *1,2,4 thiadiazole RU 21731* présenté comme une inhibiteur de "type-DCMU" ne produit aucune augmentation du niveau de fluorescence initiale ϕ_0, tandis que la relaxation de la luminescence déclenchée par cette substance présente une cinétique complexe : ces observations n'ont pas trouvé d'explication. La deuxième anomalie est observée avec l'*ioxynil*, qui possède les caractéristiques d'un inhibiteur de "type-DCMU" dans les mesures qualitatives d'induction de fluorescence de la Chl_{aII}, mais dont l'effet quantitatif est moins prononcé vis-à-vis des paramètres étudiés (ϕ_{max} , ϕ_v , A_{max}) que pour les autres inhibiteurs : cet herbicide augmente le niveau de fluorescence initiale ϕ_0 de chloroplastes pré-traités à l'hydroxylamine dans une proportion moindre que les autres inhibiteurs de "type-DCMU". Par ailleurs, aucune luminescence n'est déclenchée par l'ioxynil. Il en est déduit que ce produit peut agir sur 2 sites distincts : un site identique à celui de la DCMU, et un site du côté donneur du PS II. Cette hypothèse est confirmée par les mesures du dégagement d'O_2 obtenues, à la lumière, par des chloroplastes pour lesquels l'eau est donneur d'électrons, mais l'acide silicomolybdique devient accepteur : dans ces conditions, l'ioxynil inhibe fortement l'évolution d'O_2, réaction pratiquement insensible à la DCMU.

Une méthode simple de mise en évidence d'un site d'action commun à divers inhibiteurs de photosynthèse consiste à mettre en compétition un inhibiteur de "type-DCMU", marqué au ^{14}C, et les autres substances à étudier. Cette technique indique clairement qu'une compétition existe entre tous les inhibiteurs de "type-DCMU" vis-à-vis d'un site chloroplastique. L'*ioxynil* constitue une fois encore une exception puisque cette molécule entre bien en compétition avec les autres inhibiteurs, mais l'affinité pour le site chloroplastique envisagé est très inférieure.

Au début de ce travail, nous avons montré que certains herbicides étudiés pouvaient avoir des propriétés découplantes vis-à-vis des photophosphorylations ; de plus, ces molécules sont des inhibiteurs du transport d'électrons au niveau du complexe réactionnel PS II. La mesure des variations d'absorption à 519 nm pouvait permettre de mesurer simultanément l'effet des inhibiteurs sur les activités du PS II, du PS I et des phosphorylations. Les résultats obtenus tendent à montrer qu'il est difficile de trouver une corrélation entre les résultats obtenus par les autres méthodes, et les variations d'absorbance à 519 nm, reflet de l'évolution du champ après excitation avec un éclair actinique. Cette technique semble peu appropriée à l'étude de l'inhibition du transport d'électrons *per-se*, mais peut donner des renseignements concernant une perturbation éventuelle de la membrane photosynthétique ; de plus, les résultats obtenus mettent l'accent sur l'ambiguïté du terme "découplant".

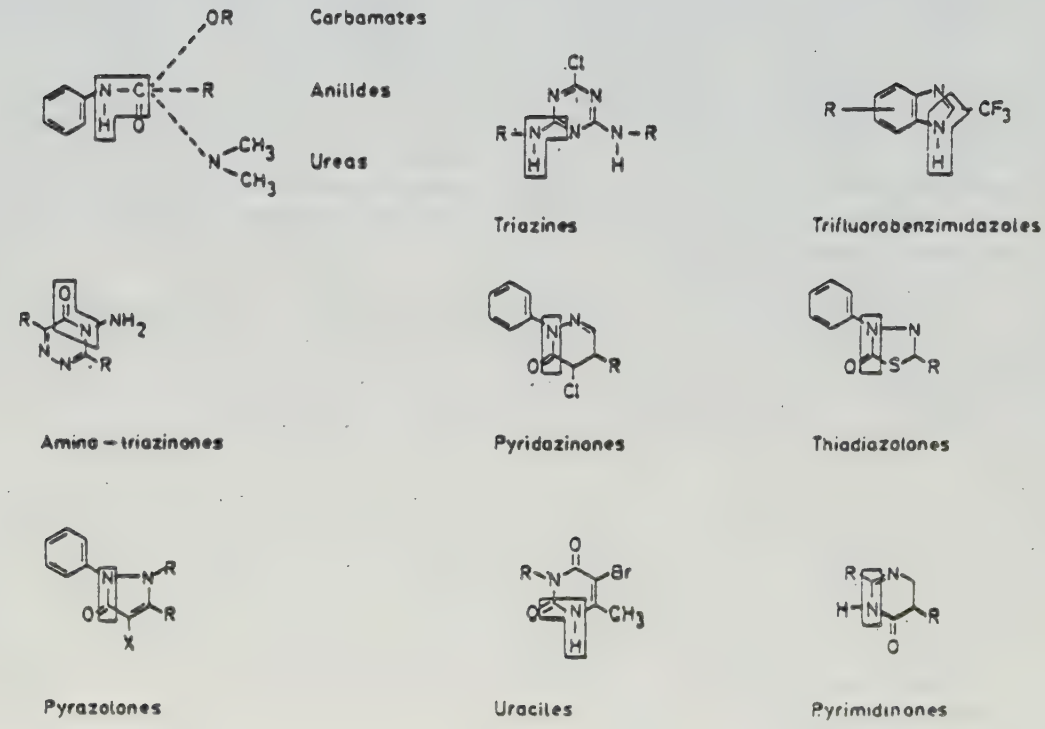


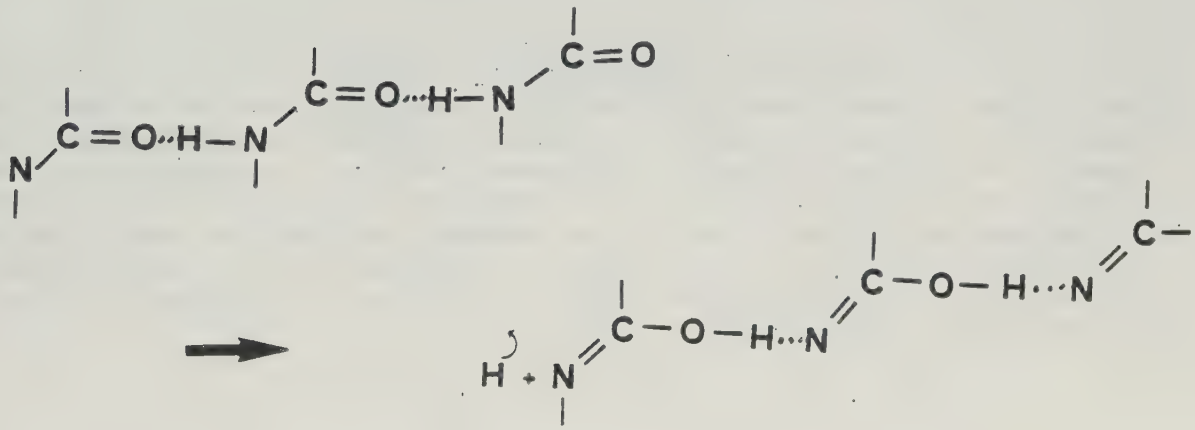
FIGURE 78 - Elément structural commun aux familles d'herbicides inhibant le transport d'électrons photosynthétique du côté accepteur du PS II (TREBST et DRABER, 1978)

Le problème de l'intéraction entre les inhibiteurs de photosynthèse et leur site d'action dans le chloroplaste a suscité depuis longtemps de nombreuses hypothèses.

En comparant la structure chimique des composés agissant sur un site commun situé entre Q et PQ, TREBST et DRABER (1979) résument les hypothèses formulées au cours de ces dernières années, c'est-à-dire la présence d'un élément essentiel à l'inhibition constitué d'un groupement N-H attaché à un atome de carbone déficient en électrons sp_2 (HANSCH, 1969), élément lié à un "transporteur" lipophile (phényle ou t-butyle). L'enchaînement commun proposé est schématisé sur la figure 78. Cette théorie, séduisante pour la plupart des structures étudiées, est prise en défaut en particulier pour les hydroxybenzonitriles halogénés, les 4 nitrophénols halogénés et les s-triazines dialcoylées en position 4 et 6.

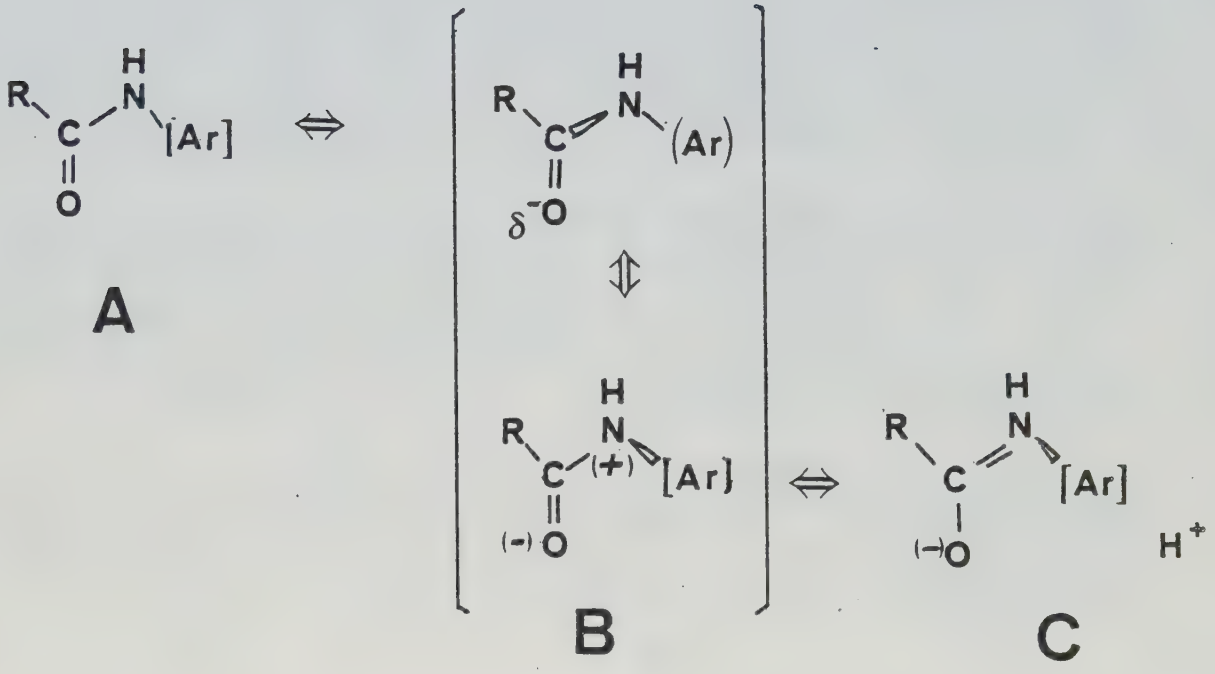
Il a été souvent suggéré que l'élément -C(=O)-NH- pouvait former des liaisons hydrogène entre le H de l'amide et les "centres actifs" du chloroplaste (BARTH et MICHEL, 1968 - CAMPER et MORELAND, 1965 - GOOD, 1961 - MORELAND, 1967 - MORELAND et HILL, 1959, 1962 et 1963). Le "centre actif" en question pouvant être une (ou plusieurs) protéine (s), les résultats obtenus après pré-traitement à la trypsine (perte de sensibilité des chloroplastes aux inhibiteurs de "type-DCMU") prennent un relief particulier.

Une théorie déjà ancienne a été proposée pour expliquer la transmission d'énergie au travers des protéines : un transfert par déplacement d'un proton peut être impliqué dans la canalisation du "pouvoir réducteur" produit photochimiquement (BAYLISS, 1951). La formation d'une liaison hydrogène au travers des chaînes polypeptidiques peut se schématiser ainsi :



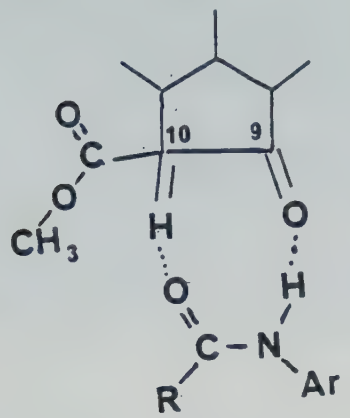
Le retrait d'un hydrogène conduit à déplacer les structures d'une forme cétonique vers une forme énolique ; à partir d'une telle forme, il existe la possibilité d'addition d'un atome d'hydrogène sur le côté droit du système ci-dessus. Ce transfert implique un léger déplacement des protons intermédiaires en plus du changement des doubles liaisons. La liaison hydrogène des inhibiteurs avec les H des groupements imino ou carbonyles des protéines stabiliserait le système soit sous une forme énolique, soit cétonique, interdisant ainsi le transfert d'énergie. Toutefois, un tel mécanisme semble improbable, puisqu'il impliquerait en fait un transfert unique, la réaction n'étant pas reversible.

En ce qui concerne les inhibiteurs de type-arylamides *(N-phényl-urées, N-phényl-amides, N-phényl-carbamates, N-acylanilides)*, la formation éventuelle de liaisons hydrogène peut résulter en l'apparition de différentes états possibles du groupe NH par superposition de formes tautomères ou mésomères :

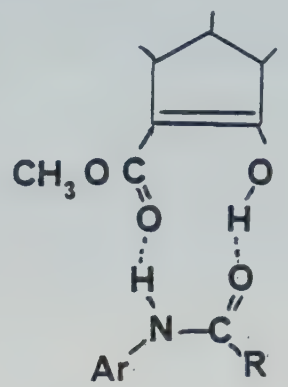


La forme "A" est prédominante, mais une tendance vers la forme "B", structure plus polaire, apparaît par migration d'électrons en direction du noyau aromatique "Ar". Celle-ci possède une distribution électronique favorable à la formation de liaisons hydrogène relativement stables ; cependant, la formation de cette structure plus polaire est limitée par le fait que l'appauvrissement en électrons du groupement amide s'accompagne d'une tendance vers la séparation d'un proton ; par suite, la structure de type "azide" (c) a perdu son aptitude à former des liaisons hydrogène, ce qui aurait pour conséquence la disparition d'un effet inhibiteur.

Un autre candidat possible pour la formation de liaison hydrogène est le noyau cyclopentanone de la chlorophylle, selon le schéma suivant :

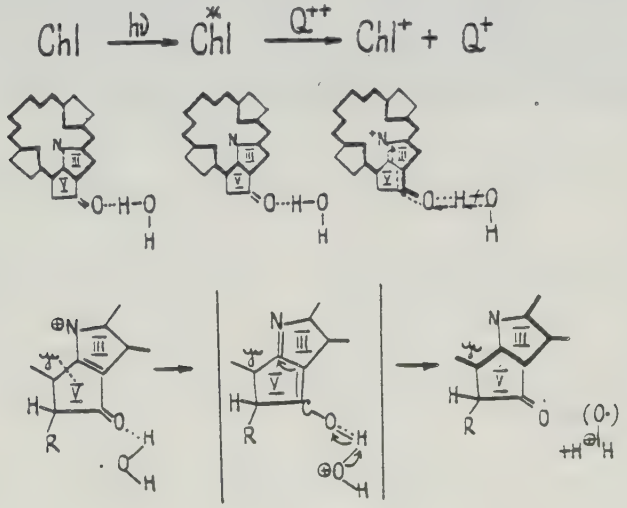


Céto



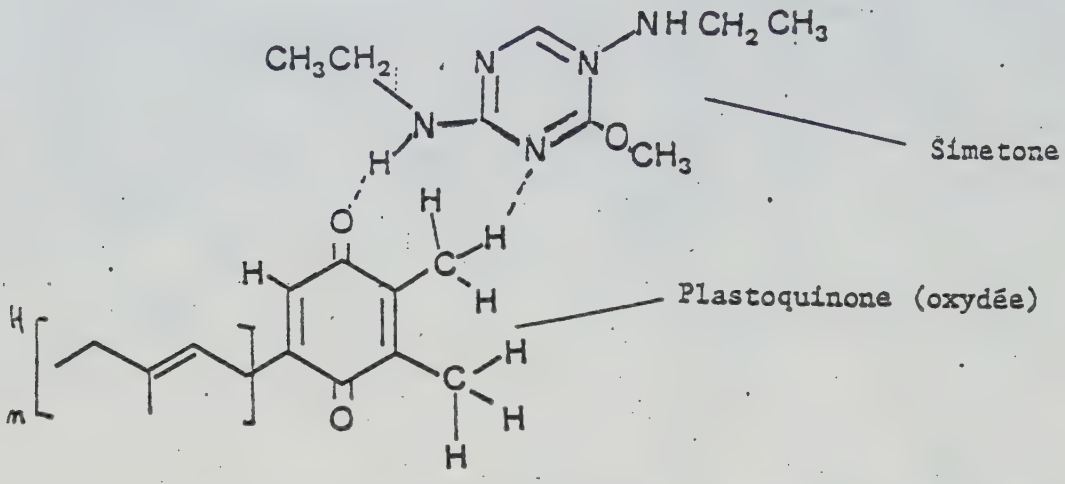
Enol

au niveau des atomes 9 et 10 (MORELAND et HILL, 1963). Au cours de la photosynthèse, l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle placé sur le carbone en 9 peut être soit remplacé, soit permettre une liaison avec un inhibiteur, en compétition avec l'eau. A cet égard, il est intéressant de comparer le mécanisme ci-dessus avec le mécanisme de photoxydation de l'eau proposé par KUTYURIN (1972) et schématisé ainsi :



Toutefois, une compétition possible entre les inhibiteurs de photosynthèse et l'eau au niveau d'une chlorophylle-antenne ou d'un holochrome n'a jamais été démontrée. De plus, il est largement admis, et ce mémoire y a contribué, que les inhibiteurs de "type-DCMU" agissent au niveau de l'accepteur secondaire du PS II. Seule une étude d'intéraction herbicide-chorophylle en solution aqueuse a été entreprise *"in-vitro"*, à la lumière par MEALLIER et al (1979) et KAPLANOVA et SOCHA (1979), tendant à montrer que des molécules du type phénylamide pouvaient accélérer la photodécomposition de la chlorophylle en solution.

Dans l'esprit de l'hypothèse d'une formation de liaisons hydrogène, il est nécessaire de mentionner la liaison possible d'une triazine avec une molécule de PQ oxydée (VAN RENSEN, 1971), selon le schéma ci-dessous :



Cette hypothèse n'a toutefois reçue aucune vérification expérimentale.

D'une manière générale, la théorie de la liaison hydrogène n'a jamais pu recevoir un support expérimental. Seuls les travaux de GOOD (1961) comportent des mesures de l'affaiblissement de la bande correspondant au groupement C=O de l'acétone en présence de triazines, par spectrométrie infra-rouge ; toutefois, l'acétone semble être un modèle discutable d'un système biologique simulé.

Dans des essais préalables qui ne sont pas décrits dans ce mémoire, nous avons essayé de trouver une interaction inhibiteur-site d'action, à l'aide de méthodes spectrométriques. Par une technique de spectrométrie de perturbation consistant à essayer de détecter au spectromètre CARY-14 des apparitions de bandes dans le visible et l'UV produites par DCMU sur des chlorelles, aucune variation notable n'a été observée dans le visible. Seul un pic important est observé à 250 nm, longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption de la PQ oxydée (AMESZ, 1977), mais également à un nombre important de molécules organiques contenues dans le chloroplaste (par exemple : les noyaux aromatiques des protéïnes), ainsi qu'à la DCMU. Compte tenu de l'importance du signal obtenu, et sur la base du coefficient d'extinction molaire de la PQ et de sa concentration dans les algues, l'augmentation de DO à 250 nm ne représente vraisemblablement que des effets non spécifiques. Cette technique mériterait d'être toutefois développée et affinée.

D'autres essais ont été entrepris par spectrométrie Raman de résonance, les spectres étant obtenus par excitation de préparation de membranes photosynthétiques par un faisceau laser de longueur d'onde de 5145 A. La comparaison entre matériel photosynthétique traité et non traité par DCMU montre qu'un grand nombre de bandes de résonance disparaissent ou se déplacent par action de l'inhibiteur. Cependant, l'attribution de ces bandes à des enchaînements structuraux chloroplastiques requiert une étude qui dépasse largement le cadre de ce mémoire. De plus, il faut signaler que la fluorescence de la chlorophylle perturbe largement les mesures de résonance. La poursuite d'un tel travail demanderait de choisir une longueur d'onde d'excitation du laser ne produisant pas de fluorescence du matériel photosynthétique. L'ampleur de la tâche semble disproportionnée, comparée à la minceur des résultats éventuellement obtenus.

Les inhibiteurs de "type-DCMU" interagissent chimiquement avec l'accepteur secondaire du PS II "B", dont on a suggéré son identité avec une molécule de plastoquinone spécialisée, liée à une protéine. A partir d'études de mécanique quantique, nous avons proposé un modèle dans lequel l'ensemble du complexe d'accepteurs d'électrons du PS II est constitué par des molécules de PQ à des états rédox différents, représentant Q, B et PQ respectivement. Le transport d'électrons entre ces molécules peut s'effectuer, selon ce modèle, par la création de complexes de transfert de charge, entre les molécules de PQ. Ce modèle, basé sur la connaissance des orbitales moléculaires vides et occupées par un ou deux électrons, pose la question fondamentale du mode d'action des inhibiteurs de "type-DCMU". En effet, la théorie de la liaison hydrogène n'a jamais été vérifiée expérimentalement ; par ailleurs, le rôle des inhibiteurs de "type-DCMU" étant de changer le potentiel de B vers une valeur plus électronégative, limitant la réoxydation de Q par B^-, on peut se demander si ces molécules ne sont pas capables de donner ou d'accepter un électron, sans que les substances en question soient des composés rédox en soi.

Nous proposons donc comme hypothèse de travail futur :

- d'entreprendre des études de capacité d'acceptation ou de donation d'électrons sur les inhibiteurs de "type-DCMU", par la méthode des orbitales moléculaires

- de rechercher la possibilité d'une association inhibiteur-PQ sous forme d'un complexe de transfert de charge

- de dégager un enseignement sur la présence nécessaire d'un élément structural ou physico-chimique commun à tous les inhibiteurs, permettant d'orienter des synthèses de futures molécules et de tester leur activité éventuelle sur la photosynthèse

- de vérifier, en cas de succès, le caractère herbicide de ces inhibiteurs de structure nouvelle

Il est évident qu'une telle approche, mettant en oeuvre des techniques de chimie théorique et requèrant l'aide de l'ordinateur compte tenu de l'importance des calculs à mettre en oeuvre (mesure des géométries des structures, des distances intératomiques et des angles de valence) dépasse largement l'optique de ce mémoire et ne peut être entreprise ici.

En conclusion, la réponse à la question de la cible à l'échelon moléculaire :

PROTEINE ou PLASTOQUINONE ?

n'est sans doute pas à rechercher en essayant d'opposer ces deux types de structures, mais plutôt en considérant leur association intime au sein de la membrane photosynthétique.

Il est possible de concilier les différentes hypothèses émises en considérant que la fraction à caractère protéïque de B représente un élément préalable, nécessaire mais insuffisant, à l'action inhibitrice en constituant le siège d'une liaison généralement non covalente (à l'exception des azido-triazines), par exemple du type hydrogène, entre inhibiteur et protéïne. L'interaction subséquente et directe entre le constituant plastoquinonique de B et l'inhibiteur pourrait ensuite intervenir, étant entendu que la chronologie fixation - action et la séparation temporelle des deux phénomènes n'est qu'un concept de l'esprit, aucune action inhibitrice sans fixation préalable n'ayant jamais été démontrée expérimentalement.

L'amorce de modélisation présentée dans ce travail devra être développée et recevoir une confirmation expérimentale solide permettant de présenter une explication cohérente de l'interaction moléculaire entre les herbicides inhibiteurs de photosynthèse et la "cible".

BIBLIOGRAPHIE

Les références citées ici ont été arrêtées à la littérature disponible en Mars 1980

ALLEN F.E. and FRANCK J. (1955) - Photosynthetic evolution of oxygen by flashes of light. Arch. Biochem. Biophys. 58 : 124-143

AMESZ J. (1964) - Spectrophotometric evidence for the participation of a quinone in photosynthesis of intact blue green algae. Biochim. Biophys. Acta 79 : 257-265

AMESZ J. (1977) - Plastoquinone *in* A. TREBST and M. AVRON - Photosynthesis I : Encyclopedia of Plant Physiology New Series, vol. 5 : 238-246, Springer Verlag

ANDREO C.J. and VALLEJOS R.H. (1974) - Uncoupling of photophosphorylation in spinach chloroplasts by the ionophorous antibiotic A 23187. FEBS Letters 46 (1) : 343-346

ARNON D.I. (1949) - Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15

ARNON D.I, LOSADA M, WHATLEY F.R, TSUJIMOTO H.Y, HALL D.O. and HORTON A.A. (1961) - Photosynthetic phosphorylation and molecular oxygen. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47 : 1314-1340

ARNTZEN C.J. (1979) - Communication personnelle

ARTHUR W.E. and STREHLER B.L. (1957) - Studies on the primary process in photosynthesis I. Photosynthetic luminescence : multiple reactants. Arch. Biochem. Biophys. 70 : 507-526

ASHTON W.D. (1972) - The logit transformation. Griffins Statistical Monographs and Curses. Ed. A. STUART

AVRON M. (1960) - Photophosphorylation by Swiss-chard chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 40 : 257-272

AVRON M. (1963) - A coupling factor in photophosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 77 : 699-702

AVRON M. (1966) - Mechanisms of photoinduced electrons transport in isolated chloroplasts. *In* D.R. SANADI (Ed) - Current topics in bioenergetics vol. II p. 1 - Academic Press

AVRON M. (1977) - Energy transduction in chloroplasts. Ann. Rev. Biochem. 46 : 143-155

AVRON M. and SHAVIT N. (1965) - Inhibitors and uncouplers of photophosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 109 : 317-331

BALLANTYNE D.J. (1972) - Fluoride inhibition of the Hill reaction in bean chloroplasts. Atmospheric Environment 6 : 267-273

BALTSCHEFFSKY M. (1960) - Inhibitor studies and light-induced phosphorylation in isolated spinach chloroplasts. Acta Chem. Scand. 14 : 264-272

BALTSCHEFFSKY M. (1975) - The effect of DBMIB on light induced reactions in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum In* M. Avron Proc. IIIrd Int. Congr. Photosynthesis vol. I : 799-806 Elsevier

BARR R., CRANE F.L. and GIAQUINTA R.T. (1975) - DCMU-insensitive reduction of silicomolybdic acid by chloroplast photosystem II. Plant Physiol. 55 : 460-462

BARTELS P.G. and HYDE A. (1970) - Chloroplast development in *4-chloro-5 (-dimethylamino) 2 (α,α,α, trifluoro m-tolyl) 3 (2 H) pyridazinone* (SAN 6706) treated wheat seedlings. Plant Physiol. 45 : 807-810

BARTELS P.G. and Mc CULLOUGH C. (1972) - A new inhibitor of carotenoid synthesis in higher plants : *4-chloro-5-(dimethylamino)-2-α,α,α (trifluoro m tolyl) 3 (2 H)-pyridazinone* (SAN 6706). Biochem. Biophys. Res. Comm. 48 (1) : 16-22

BARTH A. and MICHEL H.J. (1968) - Ueber Wirkungsmechanismen und Substituenteneinflüsse von Herbiziden des Harnstoff-, Carbamat-, Amid- und Triazintyps. Tagunsber. Deut. Akad. Landwirtschaftswiss. Berlin 109 : 41-56

BARTH A. and MICHEL H.J. (1969) - Wirkungsmechanismen und substituenteneinflüsse von Herbiziden des Harnstoff-, Carbamat-, Amid- und Triazintyps. Die Pharmazie 24 : 11-23

BARUFFINI A., BORGNA P., CALDERARA G. i MAZZA M. (1970) - p. alchiltioanilidi inibenti la reazione di Hill. Farmaco XXV (1) 427-438

BAYLISS N.S. (1951) - Conjugated compounds. Potential-energy functions, absorption spectra and ionization in linear polymers. Rev. Pure and Appl. Chem. 1 : 67-75

BELLOTI A, LOGHI E, BARUFFINI A, PAGANI G. i BORGNA P. (1968) - Attivita inibente la reazione di Hill e fitotossicita di p. alchilanilidi. Farmaco XXVII (2) 10-15

BENNOUN P. (1970) - Reoxydation du quencher de fluorescence "Q" en présence de DCMU. Biochim. Biophys. Acta 216 : 357-363

BENNOUN P. et JOLIOT A. (1969) - Etude de la photooxydation de l'hydroxylamine par les chloroplastes d'épinards. Biochim. Biophys. Acta 189 : 85-94

BENNOUN P. and LI Y.S. (1973) - New results on the mode of action of DCMU in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 292 : 162-168

BISHOP N.I. (1962) - Inhibition of the oxygen evolving system of photosynthesis by amino-triazines. Biochim. Biophys. Acta 57 : 186-189

BLACK C.C. and MYERS L. (1966) - Some biochemical aspects of the mechanisms of herbicidal activity. Weeds 14 (2) : 331-338

BLISS C.L. (1934) - The method of probits - a correction. Science 79 : 409-410

BOGER H. and KUNERT K.J. (1979) - Differential effects of herbicides upon trypsin-treated chloroplasts. Z. Naturforsch. 34c : 1015-1025

BOHME H, REIMER S. and TREBST A. (1971) - The effect of DBMIB, an antagonist of plastoquinone, on non-cyclic and cyclic electron flow systems in isolated chloroplasts. Z. Naturforsch 26b : 341-352

BOND C.P. and CORBETT J.R. (1971) - The importance of whole plant studies in determining the biochemical mode of action of herbicides, as shown by studies with the experimental compound *6-chloro-2-trifluoromethyl-imidazo (4,5-b) pyridine*. Pestic. Sci. 2 : 169-171

BOOTS M.R. (1969) - Conformational aspects of carbamates in the inhibition of the Hill reaction. J. Med. Chem. 12 : 426-428

BOOTS M.R, BOOTS S.G. and MORELAND D.E. (1970) - Conformational aspects of ureas in the inhibition of the Hill reaction. J. Med. Chem. 13 : 144

BOOTS S.G, BOOTS M.R. and MORELAND D.E. (1972) - Hill reaction inhibitors. 3 - Conformational aspects of ureas. J. Med. Chem. 15 : 330-332

BOUGES-BOCQUET B. (1973) - Electron transfer between the two photosystems in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 314 : 250-256

BOUGES-BOCQUET B. (1977) - Cytochrome f and plastocyanin kinetics in *Chlorella pyrenoidosa*. II - Reduction kinetics and electric field increase in the 10 ms range. Biochim. Biophys. Acta 462 : 371-379

BOUGES-BOCQUET B, BENNOUN P. and TABURY J. (1973) - Deactivation of oxygen precursors in presence of DCMU and phenylurethane. Biochim. Biophys. Acta 325 : 247-255

BOWES G.W. and GEE R.N. (1971) - Inhibition of Hill reaction by *1,1,1, trichloro 2,2 bis (4 chlorophenyl) ethane*. Bioenergetics 2 : 47-52

BRACHA P, LUWISCH M. and SHAVIT N. (1972) - Thiadiazoles of herbicidal activity *In* Proc. 2nd Int. IUPAC Congr. Pestic. Chem. ed. A.S. TAHORI 5 : 141-151 Gordon and Breach

BRAGINSKI L.P, GRIN V.G, KOSTENKO S.V, LAKHIN V.V and SURKOLA L.V. (1963) - Monuron and simazine as algicides. Tr. V ses. Gidrobiol. Opshchestva, Akak. Navk. SSSR 14 : 52 (dans Chem. Abstr. 61 (15) 280 (1964)

BRAND J, SAN PIETRO A. and MAYNE B.C. (1972) - Site of polylysine inhibition of photosystem I in spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 152 : 426-428

BRAND J, BASZYNSKI T, CRANE F.L. and KROGMAN D.W. (1971) - Selective inhibition of photosynthetic reactions by polycations. Biochem. Biophys. Res. Comm. 45 : 539-543

BREWER P.E, ARNTZEN C.J. and SLIFE F.W. (1979) - Effects of atrazine, cyanazine and procyazine on the photochemical reactions of isolated chloroplasts. Weed Sci. 27 (3) : 300-308

BUCHA H.C. and TODD C.W. (1951) - *3(p-chlorophenyl) 1,1-dimethylurea* - a new herbicide. Science 114 : 493-494

BUECHEL K.H. (1972) - Mechanisms of action and structure-activity relations of herbicides that inhibit photosynthesis. Pestic. Sci. 3 : 89-110

BUECHEL K.H. and DRABER W. (1969) - Structure-activity relationship of photosynthesis inhibition by NH acidic π excessive heteroaromatica in Progress in Photosynthesis Research ed. H. Metzner : 1737-1741 - Int. Union Biol. Sci. Tübingen

BUECHEL K.H, DRABER W.T, TREBST A und PISTORIUS E. (1966) - Wirkung von substituerte Benzimidazolen derivaten ouf Hill reaktion. Z. Naturforsch. 21 b : 243-255

BUTLER W.L. (1972) - On the primary nature of fluorescence yield changes associated with photosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (11) : 3420-3422

CALVAYRAC R, BOMSEL J.L. and LAVAL-MARTIN D. (1979) - Analysis and characterization of *3-(3,4-dichloro-phenyl) 1,1-dimethylurea* (DCMU)- resistant *Euglena*. Plant Physiol. 63 : 857-865

CAMPER N.D. and MORELAND D.E. (1965) - Correlations between acidity of substitued phenylamides and inhibition of the Hill reaction. Biochim. Biophys. Acta 94 : 383-393

CARLES P.M. (1979) - Communication personnelle

CHENIAE G.M. and MARTIN L.F. (1968) - Site of Mn function in photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 153 : 819-825

CHENIAE G.M. and MARTIN I.F. (1970) - Sites of function of manganese within photosystem II. Roles in O_2 evolution and system II. Biochim. Biophys. Acta 197 : 219-239

CHENIAE G.M. and MARTIN I.F. (1972) - Effects of hydroxylamine on photosystem II. II - Photoreversal of the NH_2OH - destruction of O_2 evolution. Plant Physiol 50 : 87-94

CHO D.H, PARKS L. and ZWEIG G. (1966) - Photoreduction of quinones by isolated spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 126 : 200-206

CORBETT J.R. (1974) - Herbicides interfering with photosynthesis *In* "The biochemical mode of action of pesticides" - p. 55-104 - Academic Press

CORDUAN G. (1970) - Les herbicides et leurs actions sur les plantes. Mitt. deutch. pharmazeut. Ges. 40 : 29-59

CROZE E, KELLY M. and HORTON P. (1979) - Loss of sensitivity to diuron after trypsin digestion of chloroplast photosystem II particules. FEBS Letters 103 (1) : 22-26

DELOSME R. (1967) - Etude de l'induction de fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au début d'une illumination intense. Biochim. Biophys. Acta 143 : 108-128

DELOSME R. (1967) - Contribution à l'étude des phénomènes d'induction de fluorescence chez les organismes photosynthétiques. Thèse de doctorat d'état, Paris

DELOSME R. (1972) - New results about chlorophyll fluorescence *"in vivo"*. Proc. 2nd Int. Congress. Photosynt. Res. (Stresa, 1971) W. JUNK N.V. - The Hague Tome 1 : 187-195

DELOSME R, JOLIOT P. et LAVOREL J. (1959) - Sur la complémentarité de la fluorescence et de l'émission d'oxygène pendant la période d'induction de la photosynthèse. C.R. Acad. Sci. Paris - Série D - t.249 : 1409-1411

DINER B.A. (1975) - Dependence of the turnover and deactivation reactions of PS II on the redox state of the pool A varied under anaerobic conditions *In* M. AVRON Proc. IIIrd Int. Congress Photosynt. vol.I : 589-601 Elsevier

DINER B.A. (1977) - Dependence of the deactivation reactions of PS II on the redox state of plastoquinone pool A varied under anaerobic conditions. Equilibric on the acceptor side of PS II. Biochim. Biophys. Acta 460 : 247-258

DORING G. (1976) - The chlorophyll a_{II} reaction in trypsin treated spinach chloroplasts in the presence of potassium ferricyanide. Z. Naturforsch. 31 c : 78-81

DORING G, STIEHL H.H. and WITT H.T. (1967) - A second chlorophyll reaction in the electron chain of photosynthesis. Registration by the repetitive excitation technique. Z. Naturforsch. 22 b : 639-644

DORING G, RENGER G, VATER J. and WITT H.T. (1969) - Properties of the photoreactive chlorophyll a_{II} in photosynthesis. Z. Naturforsch. Teil B 24 : 1139-1143

DORNOW A, MENZEL A. and MARX P. (1964) - Synthesis of N-containing heterocycles XXV 1,2,4 triazines (I). Preparation of *s* triazolo (3,2-c) *as* triazines. Chem. Ber. 97 : 2173-2175

DOSCHEK W.W. and KOK B. (1972) - Photon trapping in photosystem II of photosynthesis. Fluorescence rise curve in the presence of DCMU. Biophys. J. 12 (7) 832-838

DRABER W, BUECHEL K.H, DICKORE K, TREBST A. and PISTORIUS E. (1969) - Structure-activity correlation of 1,2,4-triazinones a new group of photosynthesis inhibitors. *in* H. Metzner Progress in Photosynthesis Research 1737-1741 Int. Union Bid. Sci. Tübingen

DRABER W, BUECHEL K.H, DICKORE K, TIMMLER H. and TREBST A. (1974) - Structure, activity and selectivity of 1,2,4-triazinone photosynthesis inhibitors. Quantitative studies in mechanism of pesticide action. ACS Symp. Ser. Z : 100-116 Am. Chem. Soc.

DUYSENS L.N.M. (1954) - Reversible changes in the absorption spectrum of *Chlorella* upon irradiation. Science 120 : 353-354

DUYSENS L.N.M. and SWEERS H.E. (1963) - Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence : studies an microalgae and photosynthetic bacteria ed. by Jap. Soc. Plant. Physiol. Univ. Tokyo Press 353-372

ELSTNER E.F, STOFFER C. and HEUPEL A. (1975) - Determination of superoxide free radical ion and hydrogen peroxide as products of photosynthetic oxygen reduction. Z. Naturforsch 30 c : 53-57

EMRICH H.M, JUNGE W. and WITT H.T. (1969) - Further evidence for an optical response of chloroplast bulk pigments to a light-induced electrical field in photosynthesis. Z. Naturforsch. 24 b : 1144-1146

ETIENNE A.L. (1974) - New results on the properties of photosystem II centers blocked by DCMU in their different photoactive states. Biochim. Biophys. Acta 333 : 320

ETIENNE A.L. and LAVOREL J. (1975) - Triggered-luminescence in dark adapted *Chlorella* cells and chloroplasts. FEBS Letters (57) 3 : 276 - 279

ETIENNE A.L, LEMASSON C. et LAVOREL J. (1974) - Quenching de la chlorophylle in vivo par le *m-dinitrobenzène*. Biochim. Biophys. Acta 333 : 288-300

EXER B. (1958) - Ueber Pflanzenwachstumsregulatoren : Der Einfluss von Simazin auf den Pflanzenstaffwechsel. Experienta 14 : 135-138

FINNEY D.J. (1962) - Probit analysis : a statistical treatment of the sigmoïdal response curve. Chap. 10 : 22-30 Cambridge University Press

FISCHER R.A. and YATES F. (1963) - Statistical methods in biological assay (2nd Ed.) - London Griffin

FORBUSH B. and KOK B. (1968) - Reaction between primary and secondary electron acceptors of photosystem II of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 162 : 243-253

FORTI G. and MEYER E.M. (1969) - Effect of pyrophosphate an photosynthetic electron transport reactions. Plant Physiol. 44 : 1511-1514

FOWLER C.F. and KOK B. (1974) - Direct observation of a light induced electric field in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 357 : 308-318

FRANK R. and SWITZER C.M. (1969) - Effect of pyrazon on growth, photosynthesis and respiration. Weed Sci. 17 (3) : 344-351

GABBOTT P.A. (1969) - Inhibition of photoreactions in isolated chloroplasts by *2-azido-4-alkylamino 6-alkylamino-s-triazines*. Progr. Photosynth. Res. vol. III - 1712-1727

GABBOTT P.A. and BARNSLEY G.E. (1968) - *2-azido-4-alkyl-amino-6-alkylamino-s-triazines* : a new group of herbicidal triazines. J. Sci. Fd. Agric. 19 : 16-19

GIAQUINTA R.T. and DILLEY R.A. (1975) - A partial reaction in PS II : reduction of silicomolybdate prior to the site of DCMU inhibition. Biochim. Biophys. Acta 387 : 288-305

GIBBONS L.K, KOLDENHOVEN E.F, NETHERY A.A, MONTGOMERY R.E. and PURCELL W.P. (1976) Quantitative structure-activity relationships among selected pyrimidinones and Hill reaction inhibition. J. Agric. Food Chem. 24 (2) : 203-206

GIMMLER H. (1977) - Photophosphorylation in vivo : *In* Photosynthesis I. Encyclopedia of Plant Physiology. Springer Verlag Ed. New Series vol. 5 : 448-471

GIRAULT G. and GALMICHE J.M. (1974) - Restoration by silicotungstic acid of DCMU inhibited photoreactions in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 333 : 314-319

GOLBECK J.H. and KOK B. (1979) - Redox titration of electron acceptor Q and the plastoquinone pool in photosystem II. Biochim . Biophys. Acta 547 : 347-360

GOOD N.E. (1960) - Activation of the Hill reaction by amines. Biochim. Biophys. Acta 40 : 502-517

GOOD N.E. (1961) - Inhibitors of the Hill reaction. Plant Physiol. 36 : 788-803

GOOD N.E. (1977) - Uncoupling of electron transport from phosphorylation in chloroplasts *in* Trebst and Avron Photosynthesis I. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series vol. 5 : 429-436 Springer Verlag

GOOD N.E. and IZAWA S. (1964) - Selective inhibitors of photosynthesis. Rec. Chem. Prog. 25 : 225-234

GOOD N.E. and IZAWA S. (1973) - Inhibition of photosynthesis. *In* Metabolic inhibitors. Ed. R.M. HOCHSTER, M. KATES and J.H. AVASTEL 4 : 179-214. Academic Press.

GOOD N.E, IZAWA S. and HIND G. (1966) - Uncoupling and energy transfer inhibition in photophosphorylation. Current Topics in Bioenergetics vol. 1 : 75-111. Academic Press

GODVINDJEE M.P.J, PULLES R, GODVINDJEE R, VAN GORKOM H.J. and DUYSENS L.N.M. (1976) - Inhibition of the reoxydation of the secondary electron acceptor of photosystem II by bicarbonate depletion. Biochim. Biophys. Acta 449 : 602-605

GROMET-ELHANAN Z. (1968) - Energy transfer inhibitors and electron transport inhibitors in chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 123 : 447-456

GYSIN H. and KNUESLI E. (1960-a) - Actiyity and mode of action of triazine herbicides. 4th Brit. Weed Control Conf. 225-230

GYSIN H. and KNUESLI E. (1960-b) - Chemistry and herbicidal properties of triazine derivatives. Adv. Pest. Control. Res. 3 : 289-296

HALL D.O. (1976) - The coupling of photophosphorylation to electron transport in isolated chloroplasts *In* The intact chloroplast. BARBER Ed. : 135-170 Elsevier

HANSCH C. (1969) - Theoritical considerations of the structure-activity relationship in photosynthesis inhibitors. Progress in Photosynthesis Research vol III : 1685-1692

HATZIOS K.K. and PENNER D. (1979) - Mode of action of buthidazole. Abstracts Meeting Weed Sci. Soc. Amer. San Francisco : 104-105

HAUSKA G.A. (1972) - Lipophilicity and catalysis of photophosphorylation. I - Sulfonated phenozianin compounds as ineffective in mediating cyclic photophosphorylation in PS I subchloroplast vesicles. FEBS Letters 28 (2) : 217-220

HAUSKA G.A. (1977) - Artificial acceptors and donors in Photosynthesis I. Encyclopedia of Plant Physiology - New Series, vol. 5 : 253-265 - Springer Verlag

HAUSKA G.A, Mc CARTY R.E. and RACKER E. (1970) - The site of phosphorylation associated with photosystem I. Biochim. Biophys. Acta 197 : 206-218

HAUSKA G.A, REIMER S. and TREBST A. (1974) - Nature and artificial energy conserving sites in cyclic photophosphorylation systems. Biochim. Biophys. Acta 357 : 1-13

HAUSKA G.A, TREBST A, KOETTER C. and SCHULZ H. (1975) - *1,2,3-thiadiazolyl-phenyl-ureas*, new inhibitors of photosynthetic and respiratory energy conservation. Z. Naturforsch. 30c : 505-510

HAUSKA G.A. and TREBST A. (1977) - Current topics in Bioenergetics, vol. 6 : Sanadi Ed. : 151 - Academic Press

HERCZEG T, LEHOCZKI E. and SZALAY L. (1979) - The prompt effect of pyridazinone herbicides on the primary processes of photosynthesis. FEBS Letters 108 (1) : 226-228

HEYTLER P.G. (1963) - Uncoupling of oxidative phosphorylation by *carbonyl cyanide phenylhydrazones* (CCP). I- Characteristics of *m*-Cl-CCP action on mitochondria and chloroplasts. Biochemistry 2: 357-361

HILL R. and BENDALL F. (1960) - Function of the cytochrome components in chloroplasts : a working hypothesis. Nature 186 : 136-137

HILL R. and WALKER D.A. (1959) - Pyocyanine and phosphorylation with chloroplasts. Plant Physiol. 34 : 240-245

HILTON J.L, JANSEN L.L. and HULL H.M. (1963) - Mechanisms of herbicide action. Ann. Rev. Plant Physiol. 14 : 353

HILTON J.L, MONACO T.J, MORELAND D.E. and GENTNER W.A. (1964) - Mode of action of subsitued uracil herbicides. Weeds 2 : 129-131

HILTON J.L, SCHAREN A.L, St JOHN J.B, MORELAND D.E. and NORRIS K.H. (1969) - Modes of action of pyridazinone herbicides. Weed Science 17 (4) : 541-547

HIPKINS M.F. (1978) - Kinetic analysis of the chlorophyll fluorescence inductions from chloroplasts blocked with *3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea*. Biochim. Biophys. Acta 502 : 514-523

HOFFMANN C.E. (1972) - The mode of action of bromacil and related uracils in herbicides, fungicides, formulation chemistry. Proc. IInd Int. IUPAC Congress Pest. Chem. vol. V : 65-85. A.S. TAHORI Ed. Gordon' Breach Science Publishers

HOFFMANN C.E, Mc GAHEN J.W. and SWEETSER P.B. (1964) - Effect of substitued uracil herbicides on photosynthesis. Nature 202 : 577-578

HOLLISTER T.A. and WALSH G.E. (1973) - Differential responses of marine phytoplankton to herbicides. Oxygen evolution. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 9 (5) : 291-295

HOMAN P.H. and SCHMID G.H. (1967) - Photosynthetic reactions of chloroplasts with unusual structures. Plant Physiol. 42 : 1619-1632

HOPFER U, LEHRINGER A.L. and THOMPSON T.E. (1968) - Protonic conductance across phospholipid bilayer membranes induced by uncoupling agents for oxidative phosphorylation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59 : 484-490

HOPKINS T.R, NEIGHBORS R.P. and PHILIPS L.V. (1967) - Synthesis and herbicidal activity of small ring compounds. J. Agr. Food Chem. 15 (3) : 501-508

IZAWA S. (1977) - Inhibitors of electron transport *In* : A. TREBST and M. AVRON : Photosynthesis I Encyclopedia of plant physiology. New Series vol. 5 : 266-282 Springer Verlag

IZAWA S. and GOOD N.E. (1965) - The number of sites sensitive to *3-(3,4-dichlorophenyl) 1,1-dimethylurea, 3-(4-chlorophenyl) 1,1-dimethylurea* and *2-chloro-4-(2-propylamino) 6-ethylamino-s-triazine*. Biochim. Biophys. Acta 102 : 20-38

GOOD N.E. (1960) - Activation of the Hill reaction by amines. Biochim. Biophys. Acta 40 : 502-517

GOOD N.E. (1961) - Inhibitors of the Hill reaction. Plant Physiol. 36 : 788-803

GOOD N.E. (1977) - Uncoupling of electron transport from phosphorylation in chloroplasts *in* Trebst and Avron Photosynthesis I. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series vol. 5 : 429-436 Springer Verlag

GOOD N.E. and IZAWA S. (1964) - Selective inhibitors of photosynthesis. Rec. Chem. Prog. 25 : 225-234

GOOD N.E. and IZAWA S. (1973) - Inhibition of photosynthesis. *In* Metabolic inhibitors. Ed. R.M. HOCHSTER, M. KATES and J.H. AVASTEL 4 : 179-214. Academic Press.

GOOD N.E, IZAWA S. and HIND G. (1966) - Uncoupling and energy transfer inhibition in photophosphorylation. Current Topics in Bioenergetics vol. 1 : 75-111. Academic Press

GODVINDJEE M.P.J, PULLES R, GODVINDJEE R, VAN GORKOM H.J. and DUYSENS L.N.M. (1976) - Inhibition of the reoxydation of the secondary electron acceptor of photosystem II by bicarbonate depletion. Biochim. Biophys. Acta 449 : 602-605

GROMET-ELHANAN Z. (1968) - Energy transfer inhibitors and electron transport inhibitors in chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 123 : 447-456

GYSIN H. and KNUESLI E. (1960-a) - Actiyity and mode of action of triazine herbicides. 4th Brit. Weed Control Conf. 225-230

GYSIN H. and KNUESLI E. (1960-b) - Chemistry and herbicidal properties of triazine derivatives. Adv. Pest. Control. Res. 3 : 289-296

HALL D.O. (1976) - The coupling of photophosphorylation to electron transport in isolated chloroplasts *In* The intact chloroplast. BARBER Ed. : 135-170 Elsevier

HANSCH C. (1969) - Theoritical considerations of the structure-activity relationship in photosynthesis inhibitors. Progress in Photosynthesis Research vol III : 1685-1692

HATZIOS K.K. and PENNER D. (1979) - Mode of action of buthidazole. Abstracts Meeting Weed Sci. Soc. Amer. San Francisco : 104-105

HAUSKA G.A. (1972) - Lipophilicity and catalysis of photophosphorylation. I - Sulfonated phenozianin compounds as ineffective in mediating cyclic photophosphorylation in PS I subchloroplast vesicles. FEBS Letters 28 (2) : 217-220

HAUSKA G.A. (1977) - Artificial acceptors and donors in Photosynthesis I. Encyclopedia of Plant Physiology - New Series, vol. 5 : 253-265 - Springer Verlag

HAUSKA G.A, Mc CARTY R.E. and RACKER E. (1970) - The site of phosphorylation associated with photosystem I. Biochim. Biophys. Acta 197 : 206-218

HAUSKA G.A, REIMER S. and TREBST A. (1974) - Nature and artificial energy conserving sites in cyclic photophosphorylation systems. Biochim. Biophys. Acta 357 : 1-13

HAUSKA G.A, TREBST A, KOETTER C. and SCHULZ H. (1975) - *1,2,3-thiadiazolyl-phenyl-ureas*, new inhibitors of photosynthetic and respiratory energy conservation. Z. Naturforsch. 30c : 505-510

HAUSKA G.A. and TREBST A. (1977) - Current topics in Bioenergetics, vol. 6 : Sanadi Ed. : 151 - Academic Press

HERCZEG T, LEHOCZKI E. and SZALAY L. (1979) - The prompt effect of pyridazinone herbicides on the primary processes of photosynthesis. FEBS Letters 108 (1) : 226-228

HEYTLER P.G. (1963) - Uncoupling of oxidative phosphorylation by *carbonyl cyanide phenylhydrazones* (CCP). I- Characteristics of *m*-Cl-CCP action on mitochondria and chloroplasts. Biochemistry 2: 357-361

HILL R. and BENDALL F. (1960) - Function of the cytochrome components in chloroplasts : a working hypothesis. Nature 186 : 136-137

HILL R. and WALKER D.A. (1959) - Pyocyanine and phosphorylation with chloroplasts. Plant Physiol. 34 : 240-245

HILTON J.L, JANSEN L.L. and HULL H.M. (1963) - Mechanisms of herbicide action. Ann. Rev. Plant Physiol. 14 : 353

HILTON J.L, MONACO T.J, MORELAND D.E. and GENTNER W.A. (1964) - Mode of action of subsitued uracil herbicides. Weeds 2 : 129-131

HILTON J.L, SCHAREN A.L, St JOHN J.B, MORELAND D.E. and NORRIS K.H. (1969) - Modes of action of pyridazinone herbicides. Weed Science 17 (4) : 541-547

HIPKINS M.F. (1978) - Kinetic analysis of the chlorophyll fluorescence inductions from chloroplasts blocked with *3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea*. Biochim. Biophys. Acta 502 : 514-523

HOFFMANN C.E. (1972) - The mode of action of bromacil and related uracils in herbicides, fungicides, formulation chemistry. Proc. IInd Int. IUPAC Congress Pest. Chem. vol. V : 65-85. A.S. TAHORI Ed. Gordon' Breach Science Publishers

HOFFMANN C.E, Mc GAHEN J.W. and SWEETSER P.B. (1964) - Effect of substitued uracil herbicides on photosynthesis. Nature 202 : 577-578

HOLLISTER T.A. and WALSH G.E. (1973) - Differential responses of marine phytoplankton to herbicides. Oxygen evolution. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 9 (5) : 291-295

HOMAN P.H. and SCHMID G.H. (1967) - Photosynthetic reactions of chloroplasts with unusual structures. Plant Physiol. 42 : 1619-1632

HOPFER U, LEHRINGER A.L. and THOMPSON T.E. (1968) - Protonic conductance across phospholipid bilayer membranes induced by uncoupling agents for oxidative phosphorylation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59 : 484-490

HOPKINS T.R, NEIGHBORS R.P. and PHILIPS L.V. (1967) - Synthesis and herbicidal activity of small ring compounds. J. Agr. Food Chem. 15 (3) : 501-508

IZAWA S. (1977) - Inhibitors of electron transport *In* : A. TREBST and M. AVRON : Photosynthesis I Encyclopedia of plant physiology. New Series vol. 5 : 266-282 Springer Verlag

IZAWA S. and GOOD N.E. (1965) - The number of sites sensitive to *3-(3,4-dichlorophenyl) 1,1-dimethylurea, 3-(4-chlorophenyl) 1,1-dimethylurea* and *2-chloro-4-(2-propylamino) 6-ethylamino-s-triazine*. Biochim. Biophys. Acta 102 : 20-38

IZAWA S, GOULD J.M, ORT D.R, FELKER P. and GOOD N.E. (1973) - Electron transport and phosphorylation in chloroplasts as a function of the electron acceptor. III. A dibromothymoquinone-insensitive phosphorylation associated with photosystem II. Biochim. Biophys. Acta 305 : 119-129

JACKSON C, DENCH J, MOORE A.L, HALLIWELL B, FOYER L.H. and HALL D.O. (1978) - Subcellular localization and identification of superoxide dismutase in leaves of higher plants. Eur. J. Biochem. 91 (2) : 339-344

JAGENDORF A.T. (1975) - Mechanisms of photophosphorylation. *In :* Govindjee Ed, Bioenergetics of photosynthesis: 414-485 Academic Press

JAGENDORF A.T. (1977) - Photophosphorylation. *In :* Photosynthesis I (A. TREBST and M. AVRON Ed.) - Encyclopedia of Plant Physiol. New Series vol. 5 : 307-337 Springer Verlag

JAGENDORF A.T. and AVRON M. (1958) - Cofactors and rates of photosynthetic phosphorylation by spinach chloroplasts. J. Biol. Chem. 231 : 277-290

JAGENDORF A.T. and URIBE E. (1966) - ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55 : 170-177

JENNINGS R.C. and FORTI G. (1975) - Fluorescence induction in intact spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 396 : 63-71

JOLIOT A. (1966) - Action du chloromethylurée et l'hydroxylamine sur la réaction photochimique d'émission d'oxygène (système II). Biochim. Biophys. Acta 126 : 587-590

JOLIOT P. (1965) - Etudes simultanées de fluorescence d'émission d'oxygène photosynthétique. Biochim. Biophys. Acta 102 : 135-148

JOLIOT P. (1968) - Kinetic studies of photosystem II in photosynthesis. Photochem. Photobiol. 8 : 451-463

JOLIOT P, BARBIERI G. et CHABAUD R. (1969) - Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II. Photochem. Photobiol. 10 : 309-329

JOLIOT P, BENNOUN P. et JOLIOT A. (1973) - New evidence supporting energy transfer between photosynthetic units. Biochim. Biophys. Acta 305 : 317-328

JOLIOT P. and DELOSME R. (1974) - Flash-induced 519 nm absorption change in green-algae. Biochim. Biophys. Acta 357 : 267-284

JOLIOT A. et JOLIOT P. (1964) - Etude cinétique de la réaction photochimique libérant l'oxygène au cours de la photosynthèse. C.R. Acad. Sc. Paris t.258 : 4622-4625

JOLIOT P. et JOLIOT A. (1971) - Hétérogénéité des accepteurs d'électrons de la réaction photochimique II en photosynthèse. CR. Acad. Sc. Paris t.272 : 2604-2607

JOLIOT P. et JOLIOT A. (1972) - Studies on the quenching properties of the photosystem II electron acceptor. *In :* Proc. IInd Int. Congress Phot. Res. Tome 1 : 26-36 W. JUNK N.V.

JOLIOT P. and JOLIOT A. (1973) - Different types of quenching involved in photosystem II centers. Biochim. Biophys. Acta 462 : 559-574

JOLIOT P. and JOLIOT A. (1979) - Comparative study of the fluorescence yield and of the C_{550} absorption change at room temperature. Biochim. Biophys. Acta 546 : 93-105

JUNGE W. and AUSLANDER W. (1973) - The electric generation in photosynthesis of green plants. I. Vectorial and protolytic properties of the electron transport chain. Biochim. Biophys. Acta 333 : 59-70

JUNGE W. and WITT H.T. (1968) - On the ion transport system of photosynthesis. Investigation on a molecular bond. Z. Naturforsch 23b : 244-254

KAISER W. and URBACH W. (1976) - Rates and properties of endogenous cyclic photophosphorylation of isolated intact chloroplasts measured by CO_2 fixation in the presence of dihydroxyacetone-phosphate. Biochim. Biophys. Acta 423 : 91-102

KANDLER O. (1960) - Energy transfer through phosphorylation mechanisms in photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. 11 : 37-50

KAPLANOVA M. and SOCHA J. (1977) - The effect of herbicides on the photooxidation of chlorophyll *a* in solution. Photosynthetica 11 (3) : 276-281

KATOH S. and SAN PIETRO A. (1967) - Ascorbate-supported NADP photoreduction by heated *Euglena* chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 122 : 144-152

KAUTSKY H, APPEL W. and AMMAN H. (1960) - Chlorophyll-fluorescenz und Kohlensäureassimilation. XIII- Mitteilung Die Fluorescenzkurve und die Photochemie der Pflanze. Biochem. Z. 332 : 277-285

KERR M.W. and WAIN R.L. (1964) - Inhibition of the ferricyanide Hill reaction of isolated bean leaf chloroplasts by *3,5-diodo-4-hydroxybenzonitrile* (ioxynil) and related compounds. Ann. Appl. Biol. 54 : 447-450

KIMIMURA M. and KATOH S. (1972) - Studies on electron transport associated with photosystem I. Biochim. Biophys. Acta 283 : 279-292

KNUDSEN L.F. and CURTIS J.M. (1947) - The use of the angular transformation in biological assays. J. Amer. Statist. Assoc. 42 : 282-296

KOK B, FORBUSH B. and Mc GLOIN M. (1970) - Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution. I - A linear form stop mechanism. Photochem. Photobiol. 11 (6) : 457-475

KRATKY B.A. and WARREN G.F. (1971) - The use of three simple, rapid bioassay on 42 herbicides. Weed Res. 11 : 257-263

KROGMAN D.W, JAGENDORF A.T. and AVRON M. (1959) - Uncouplers of spinach chloroplast photosynthetic photophosphorylation. Plant Physiol. 34 : 272-277

KUTYURIN V.M. (1972) - On the mechanism of water decomposition during photosynthesis *In :* Proc. 2nd Int. Congress on Photosynthesis vol.1 : 93-105 W. JUNK N.V.

LAMBERT R, KUNERT K.J. and BÖGER P. (1979) - On the phytotoxic mode of action of nitrofen. Pest. Biochem. Physiol. 11 : 267-274

LAVERGNE J. (1974) - Fluorescence induction in algae and chloroplasts. Photochem. Photobiol. 20 : 377-386

LAVOREL J. (1959) - Induction of fluorescence on quinone poisoned chlorella cells Plant Physiol. 34 : 2021

LAVOREL J. (1966) - Cinétique de la fluorescence photostimulée de la chlorophylle in-vivo *In :* Currents in Photosynthesis. Ed. Thomas et Gordheer : 39-47 Ad. Donker. Rotterdam

LAVOREL J. (1968) - Sur une relation entre fluorescence et luminescence dans les systèmes photosynthétiques. Biochim. Biophys. Acta 153 (3) : 727-730

LAVOREL J. (1971) - Fluorescence and luminescence studies of in-vivo chlorophyll with a laser phosphoroscope. Photochem. Photobiol. 14 (3) : 261-275

LAVOREL J. (1975) - Luminescence *In :* Govindjee Bioenergetics of Photosynthesis : 223-317 Academic Press

LAVOREL J. (1976) - Photosynthèse et organisation moléculaire. Courrier CNRS 22 : 19-24

LAVOREL J. (1980) - A study of dark luminescence in *Chlorella* : bacgroung luminescence, DCMU-triggered luminescence and H_2O_2 chemiluminescence. Biochim. Biophys. Acta 590 : 385-399

LOSADA M, TREBST A. and ARNON D.I. (1960) - Photosynthesis by isolated chloroplasts. XI. CO_2 assimilation in a reconstitued chloroplast system. J. Biol. Chem. 235 (3) : 832-839

LOSADA M, WHATLEY F.R. and ARNON D.I. (1961) - Separation of 2 light reactions in non-cyclic photophosphorylation of green plants. Nature : 190-606

Mc CARTY R.E. (1971) - *in* Methods in Enzymology vol. XXIII : 251, Ed. KOLOWICK and KAPLAN - Academic Press

Mc CARTY R.E. (1974) - Inhibition of electron transport in chloroplasts between the two photosystems by a water-soluble carbodiimide. Arch. Biochem. Biophys. 161 : 93-99

Mc CARTY R.E. (1977) - Energy transfer inhibitors of photophosphorylation in chloroplasts. *In :* Photosynthesis I (A. Trebst and M. Avron Ed.) Encyclopedia of Plant Physiology - New Series vol. 5 : 437-447 Springer Verlag

Mc CARTY R.E. and COLEMAN C. (1969) - The uncoupling of photophosphorylation by Valinomycin and ammonium chloride. J. Biol. Chem. 244 (16) : 4292-4298

Mc CARTY R.E, GUILLORY R.J. and RACKER E. (1965) - Dio 9, an inhibitor of coupled electron transport and phosphorylation in chloroplasts. J. Biol. Chem. 240 (12) PC . 4822 - 4823

Mc CARTY R.E. and RACKER E. (1966) - Brookhaven Symp. Biol. 19 : 202

MAGNUSSON R.P. and Mc CARTY R.E. (1975) - Influence of adenine nucleotides on the inhibition of photophosphorylation in spinach chloroplasts by *N-ethylmaleimid* J. Biol. Chem. 250 (7) : 2593-2598

MALKIN S. (1977) - Delayed luminescence. *In :* Photosynthesis I (A. Trebst and M. Avron Ed.) Encyclopedia of Plant Physiology - New Series vol. 5 : 473-491 Springer Verlag

MALKIN S. and KOK B. (1966) - Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts. I. Number of compounds involved in the reaction and quantum yield. Biochim. Biophys. Acta 126 : 413-432

MANTAI K.E. (1970) - Some effects of hydrolytic enzymes on coupled and uncoupled electron flow in chloroplasts. Plant Physiol. 45 (5) : 563-566

MATHIS P. and HAVEMAN J. (1977) - Analysis of absorption changes in the UV related to charge-accumulating electron carriers in PS II of chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 461 : 167-181

MATSUNAKA S. (1969) - Acceptor of light energy in photoactivation of diphenylether herbicides. J. Agr. Food Chem. 17 : 171-175

MAUZERALL D. (1972) - Light induced fluorescence changes in *Chlorella* and the primary photoreactions for the production of oxygen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 : 1358-1362

MAYNE B.C. and CLAYTON R.K. (1966) - Luminescence of chlorophyll in spinach chloroplasts induced by acid-base transition. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55 : 494-497

MEALLIER P, PERCHERANCIER J.P. et POUYET B. (1980) - Influence des herbicides sur le comportement photochimique des chlorophylles. A. - Influence des amides substituées. Chemosphère - sous presse -

MEES G.C. (1960) - Experiments on the herbicidal effect of *1,2'-ethylene 2,2' dipyridylium dibromide*. Ann. Applied Biol. 48 : 601

MEIKLE R.W. (1970) - Inhibition of photosynthesis by pyrichlor. Weed Sci. 18 (4) : 475-478

MELIS A. (1978) - Oxidation-reduction potential dependence of the two kinetic components in chloroplast system II primary photochemistry. FEBS Letters 95 (2) : 202-206

MELIS A. and DUYSENS L.N.M. (1979) - Biphasic energy conversion kinetics and absorbance difference spectra of photosystem II of chloroplasts. Evidence for two different photosystem II reaction-centers. Photochem. Photobiol. 29 : 373-382

MELIS A. and HOMANN P.H. (1975) - Kinetic analysis of the fluorescence induction in DCMU-poisoned chloroplasts. Photochem. Photobiol. 21 : 431-437

MELIS A. and HOMANN P.H. (1978) - A selective effect of Mg^{2+} on the photochemistry at are type of reaction center in photosystem II of chloroplasts. Arch. Biochem Biophys. 190 (2) : 523-530

MELIS A. and SCHREIBER U. (1979) - The kinetic relationship between the C-550 absorbance change, the reduction of Q (ΔA_{320}) and the variable fluorescence yield change in chloroplasts at room temperature. Biochim. Biophys. Acta 547 : 47-57

MIGINIAC-MASLOW M. and MOYSE A. (1969) - Photophosphorylation of isolated intact chloroplasts. Progr. Photosyn. Res. Proc. Int. Congr. 3 : 1203-1212 H. Metzner Ed.

MILES D, POLEN P, FARAG S, GOODIN R, LUTZ J, MOUSTAFA A, RODRIGUEZ B, WELL C. (1973) Mercury (2 +) ion - DCMU independent electron transport acceptor of PS II. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50 : 1113-1118

MINE A. and MATSUNAKA S. (1975) - Mode of action of bentazon. Pest. Biochem. Physiol. 5 : 444-450

MITCHELL P. (1961) - Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 191 : 144-148

MITCHELL P. (1966) - Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 41 (3) : 445-502

MITCHELL P. (1977) - Vectorial chimiosmotic processes. Ann. Rev. Biochem. 46 : 996-1006

MORELAND D.E. (1967) - Mechanisms of action of herbicides. Ann. Rev. Plant Physiol. 18 : 365-386

MORELAND D.E. (1969) - Inhibitors of chloroplast electron transport : structure-activity relations. *In :* Progress in Photosynthesis Research vol.III : 1693-1711 (H. Metzner Ed.)

MORELAND D.E. (1977) - Mode of action of herbicides. ACS Symposium Series n° 37, Pesticide Chemistry in the 20th Century J.R. Plimmen Ed. : 56-75

MORELAND D.E. (1980) - Mechanisms of action of herbicides. Ann. Rev. Plant Physiol. 31 : 597-638

MORELAND D.E. and BLACKMON W.J. (1970) - Effects of *3,5-dibromo-4-hydroxybenzaldehyde O-(2,4 dinitro-phenyl) oxime* on reactions of mitochondrie and chloroplasts. Weed Sci. 18 (3) : 419-426

MORELAND D.E, BLACKMON W, TODD H.G. and FARMER F.S. (1980) - Effects of diphenyl-ether herbicides on reactions on mitochondrie a and chloroplasts. Weed Sci. 18 (5) : 636-642

MORELAND D.E, FARMER F.S. and HUSSEY G.G. (1972) - Inhibition of photosynthesis and respiration by substitued 2,6 dinitroaniline herbicides. Pest. Biochem. Physiol. 2 : 342-353

MORELAND D.E, GENTNER W.A, HILTON J.L. and HILL K.L. (1959) - Studies on the mechanism of herbicidal action of *2-chloro-4-6-bis (ethylamino)-s-triazine*. Plant Physiol. 34 : 432-440

MORELAND D.E. and HILL K.L. (1959) - The action of alkyl-N-phenylcarbamates on the photolytic activity of isolated chloroplasts. J. Agr. Food Chem. 7 (12) 833-837

MORELAND D.E. and HILL K.L. (1962) - Interference of the Hill reaction of isolated chloroplasts. Weeds 10 : 229-236

MORELAND D.E. and HILL K.L. (1963.a) - Inhibition of photochemical activity of isolated chloroplasts by acylanilides. Weeds 11 (1) : 55-60

MORELAND D.E. and HILL K.L. (1963.b) - Inhibition of photochemical activity of isolated chloroplasts by polycyclic ureas. Weeds 11 (4) : 284-287

MORELAND D.E. and HILTON J.L. (1976) - Actions on photosynthetic systems. *In :* Herbicides, Physiology and mode of action. J.L. Audus Ed. Chap. 16 : 493-523 Academic Press

MORELAND D.E. and HUBER S.C. (1979) - Inhibition of photosynthesis and respiration by substitued 2,6 dinitro-aniline herbicides. III. Effects on electron transport and membrane properties of isolated mung bean mitochondria. Pest. Biochem. Physiol. 11 : 247-257

MORELAND D.E., HUSSEY G.G. and FARMER F.S. (1974) - Comparable effects of dichlobenil and its phenolic alteration products on photo - and oxidative phosphorylation. Pest. Biochem. Physiol. 4 : 356-364

MUNDAY J.L. and GOVINDJEE (1969) - Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a *in vivo*. III. Dip and peak in the fluorescence transient in *Chlorella pyrenoidosa*. Biophys. J. 9 : 1-21

MURATA N, NISHIMURA M. and TAKAMIYA A. (1966) - Fluorescence in photosynthetic systems. II. Induction of fluorescence in isolated spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 120 : 23-33

NELSON N, NELSON H. and RACKER E. (1972) - Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XII. Purification and properties of an inhibitor isolated from chloroplast coupling factor 1. J. Biol. Chem. 247 (23) 7657-7662

NOLAN W.G. and BISHOP D.G. (1975) - The site of inhibition of photosynthetic electr transfer by Amphotericin B. Arch. Biochem. Biophys. 166 : 323-329

ORT D.E. and IZAWA S. (1973) - Studies on the energy-coupling sites of photophosphorylation. II. Treatment of chloroplasts with NH_2OH plus EDTA to inhibit wate oxidation *in* maintaining energy coupling efficiencies. Plant Physiol. 52 : 595-600

ORT D.E. and IZAWA S. (1974) - Studies on the energy-coupling sites of photophosphorylation. V. Phosphorylation efficiencies (P/e_2) associated with aerobic photooxidation of artificial electron donors. Plant Physiol. 53 : 370-376

PAILLOTIN G. (1976) - Movement of excitations in the photosynthetic domains of photosystems II. J. Theor. Biol. 58 (1) : 237-252

PALLETT K.E. and DODGE A.D. (1977) - Silicomolybdate reduction by isolated pea chloroplasts. Photochemistry 16 (4) : 427-429

PALLETT K.E. and DODGE A.D. (1979) - Sites of action of photosynthetic inhibitor herbicides ; experiments with trypsinated chloroplasts. Pest. Sci. 10 : 216-220

PAN R.L. and IZAWA S. (1979) - PS II energy coupling in chloroplasts with H_2O_2 as electron donor. Biochim. Biophys. Acta 547 : 311-319

PAPAGEORGIOU G. (1975) - Chlorophyll fluorescence *In :* Bioenergetics of Photosynthesis (Govindjee Ed.) : 319-371 - Academic Press

PATON D. and SMITH J.E. (1965) - The effect of 4-hydroxy-3,5 di-iodobenzonitrile on CO_2 fixation, ATP formation and NADP-reduction in chloroplasts of *Vicia faba L.* Weed Res. 5 (1) : 75-78

PEREIRA F.J, SPLITTSFOESSER W.E. and HOFEN H.J. (1971) - Response of plant tissues to nitrofen. Weeds Sci. 19 (6) : 622-666

PFISTER K. and ARNTZEN L.J. (1979) - The mode of action of photosystem II specific inhibitors in herbicide resistant weed biotypes. Z. Naturforsch. 34.c : 996-1009

PHILLIPS J.N, BROWN B.T, GEISSLER A.E. and RATTIGAN B.M. (1978) - A comparison of Hill inhibition and herbicidal activity of N-3-alkoxyuracil derivatives. Abstr. IVth Int. Congress Pest. Chem. (IUPAC) Zürich, July 1978 : II - 451

PHUNG-NHU-HUNG (1967) - Quelques effets du 3 amino, 1,2,4-triazole sur le métabolisme des feuilles de l'*Oryza sativa L.* Physio. Vég. 5 : 155-205

PRITCHARD M.K. and WARREN G.F. (1979) - Site of action of oxyfluorfen. Abstracts Meeting Weed Sci. Soc. Amer. San Francisco : p.98

PULLES M.P.J, VAN GORKOM H.J. and WILLEMSEN J.G. (1976) - Absorbance changes due to the charge accumulating species in system 2 of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 449 : 546-540

PULLMAN B. and PULLMAN A. (1960) - Electronic aspects of biochemistry. Revs. Modern Phys. 32 : 428-436

RAO K.K, CAMMACK R, HALL D.O. and JOHNSON C.E. (1971) - Mössbauer effect in *Scenedesmus* and spinach ferredoxins. The mechanism of electron transfer in plant-type iron-sulplur proteins. Biochem. J. 122 : 257-265

REEVES S.G. and HALL D.O. (1973) - The stoichiometry (ATP/$2e^-$ ratio) of non-cyclic phosphorylation in isolated spinach chloroplasts. Biochem. Biophys. Acta 314 : 66-78

REGEL E, BUCHEL K.H. and TREBST A. (1970) - Travaux non publiés, cités dans : MORELAND and HILTON (1976)

REIMER S, LINK K. and TREBST A. (1979) - Comparison of the inhibition of photosynthetic reactions in chloroplasts by dibromothymoquinone, bromonitrothymol and ioxynil. Z. Naturforsch. 34.c : 419-426

RENGER G. (1972) - The action of 2-anilinothiophenes as accelerators of the deactivation reactions in the watersplitting enzyme system of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta : 256 : 428-439

RENGER G. (1973) - The action of DCMU on the water splitting enzyme system Y of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 314 : 113

RENGER G. (1974) - Studies on the reaction mechanism of the oxidizing equivalents produced by system II. *In :* M. AVRON Proc. IIIrd Int. Congress Photos. vol. 1 : 127-144 Elsevier

RENGER G. (1976) - Studies on the structural and functional organization of system II of photosynthesis. The use of trypsin as a structurally selective inhibitor at the outer surface of the thylakoid membrane. Biochim. Biophys. Acta 440 : 287-300

RENGER G. (1979) - Studies about the mechanism of herbicidal interaction with photosystem II in isolated chloroplasts. Z. Naturforsch. 34.c : 1010-1014

RENGER G, ERIXON K, DÖRING G. and WOLFF C. (1976) - Studies on the nature of the inhibitory effect of trypsin on the photosynthetic electron transport of system II. Biochim. Biophys. Acta 440 : 278-286

RENGER G. and SCHMID G.H. (1977) - On the correlation between the amplitude of the electrochromic absorption changes and the number of bulk pigments. Z. Naturfors 32.c : 963-967

RENGER G. and TIEMAN R. (1979) - Studies on the proton transport at system II in trypsin-treated spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 545 : 316-324

RENGER G. and WOLFF Ch. (1975) - Studies on the nature of the primary reactions of photosystem II in photosynthesis I. The electrochromic 515 nm absorption change an appropriate indicator for the functional state of the photochemical active centers of system II in DCMU poisoned chloroplasts. Z. Naturforsch. 30.c : 161-171

RIENITS K.G, HARDT H. and AVRON M. (1973) - ATP-driven reverse electron transport in chloroplasts. FEBS Letters 33 : 28-32

ROBINSON S.J, YOCUM C.F, IKUMA H. and HAYASHI F. (1977) - Inhibition of chloroplast electron transport reactions by trifluralin and diallate. Plant Physiol. 60 : 840-844

ROSA L. (1979) - The ATP/2e ratio during photosynthesis in intact spinach chloroplasts. Biochem. Biophys. Res. Comm. 88 (1) : 154-162

ROSA L. and HALL D.O. (1976) - Phosphorylation in isolated chloroplasts coupled to DCMU-insensitive silicomolybdate reduction. Biochim. Biophys. Acta 449 : 23-36

RUMBERG B.und WITT H.T. (1964) - Analyse der photosynthese mit Blitzlicht. I. Die Photooxidation von Chlorophyll a_I 430-703. Z. Naturforsch. 19.b : 693-707

RUZO L.O, ZABIK M.J. and SCHUETZ R.D. (1974) - Photochemistry of bioactive compound *1-(4-chlorophenyl) 3-(2,6 dihabobenzoyl) ureas*. J. Agr. Food Chem. 22 (6) : 1106-1108

SCHAEFER G, TREBST A. und BUECHEL K.H. (1975) - *2 anilino-1,3,4 thiadiazole*, Hemmstoffe der oxidativen und photosynthetischen Phosphorylierung. Z. Naturforsch. 30.c : 183-189

SCHMIDT R.R, DRABER W, EUE L. and TIMMLER H. (1975) - Herbicidal activity and selectivity of new *3-alkyl-4-amino-6-aryl-1,2,4-triazin-5-ones*. Pestic. Sci. 6 : 239-244

SCHMIDT S, REICH R. and WITT H.T. (1971) - Electrochromic measurements in vitro as a test for the interpretation of field indicating absorption changes in photosynthesis. Proc. IInd Int. Congress on Photosynthesis 1 : 1087-1095

SCHULZ H. (1969) - Structure-activity relationship of the inhibition of photosynthesis by biscarmates herbicides. *In :* Progress in Photosynthesis Research vol. III : 1752-1760

SELMAN B.R, BANNISTER T.T. and DILLEY R.A. (1973) - Trypsin-inhibitor of electron transport. Biochim. Biophys. Acta 292 : 566-581

SHIBATA K. and YAKUSHIJI E. (1933) - The reaction mechanism of photosynthesis. Naturwissenchaften 21 : 267-268

SHIRAKAWA N, TAKEUCHI M, MURAKAMI Y. and TOGASHI K. (1969) - Relationship between chemical structure of new amine derivatives and plant physiological activity. J. Agr. Chem. Soc. Japan : 43 (1) : 28-36

SMITH J.E, PATON D. and ROBERTSON M.M. (1966) - Herbicides and electron transport. *In :* 8th British Weed Control Conference vol. 1 : 278-282

SOFROVA P, VILIM V. and LEBLOVA S. (1976) - Non reactivation of the trypsin-inhibited Hill-reaction activity in the blue-green algae *Plectonema boryanum*. Photosynthetica 10 (2) 198-200

SOUZA-MACHADO V, ARNTZEN C.J, BANDEEN J.D. and STEPHENSON G.R. (1978) - Comparative triazine effects upon photosystem II photochemistry in chloroplasts of two common lambsquarters biotypes. Weed Sci. 26 : 318-325

STEINBACK K. (1980) - Communication personnelle

STREHLER B.L. and ARNOLD W. (1951) - Light production by green plants. J. Gen. Physiol. 34 : 809-829

STROTMAN H, TISCHER W. and EDELMAN K. (1974) - Specific binding of inhibitors by electron carriers of the photosynthetic electron transport chain. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 87 : 457-461

SUSUKI T. and UCHIYAMA M. (1975) - Inhibitory effect of parathion on the photosynthetic electron transport system in isolated spinach chloroplasts. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 14 (5) : 552-557

SWANSON C.R. (1972) - Mode of action of 2,4-dinitroanilines herbicides *in* : Herbicides, fungicides, formulation chemistry (A.S. TAHORI Ed.) - Proc. 2nd Int. IUPAC Congress vol. V : 87-112

SZENT-GYORGYI A. (1960) - Introduction to a Submolecular Biology. Academic Press

TAKEMATSU T,TAKEUCHI Y. and TAMURA S. (1972) - Preemergence herbicidal activities of 3-phenoxypyridazine derivatives. Weed Sci. 20 (4) : 327-329

TAUSSKY H.H. and SHORR E. (1953) - A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem. 202 : 675-685

TEICHLER-ZALLEN D. and HOCH G. (1967) - Cyclic electron transport in algae. Arch. Biochem. Biophys. 120 : 227-230

TEMPLEMAN W.G. and SEXTON W.A. (1945) - Effect of some aryl carbamic esters and related compounds upon cereals and other plant species. Nature 156 : 630-631

TISCHER W. and STROTMANN H. (1977) - Relationship between inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of photosynthetic electron transport. Biochim. Biophys. Acta 460 : 113-125

TISCHER W. and STROTMAN H. (1979) - Some properties of the DCMU-binding site in chloroplasts. Z. Naturforsch. 34 c : 992-995

TREBST A. (1963) - Zur Hemmung photosynthetischer Reaktionen in isolierten Chloroplasten durch *Salicylaldoxim*. Z. Naturforsch. 18.b : 817-821

TREBST A. (1970) - Neue Reaktionen und Substanzen im photosynthetischen Elecktronen transport. Ber. deut. bot. Ges. 83 : 373

TREBST A. (1972) - Measurement of Hill reactions and photoreduction. Methods in Enzymol. 24.B : 146

TREBST A. (1974) - Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. Ann. Rev. Plant Physiol. 25 : 423-458

TREBST A. (1978) - Inhibition of photosynthetic electron flow by phenol and diphenylether herbicides in control and trypsin-treated chloroplasts. Z. Naturforsch. 34.c : 986-991

TREBST A. and BURBA M. (1967) - Uber die Hemmung photosynthetischen Reaktion in isolierten chloroplasten und *Chlorella* durch Disalicylidenpropandiamin. Z. Pflanzenphysiol. 57 : 419-483

TREBST A. and DRABER W. (1979) - Structure-activity correlations of recent herbicides in photosynthetic reactions. *In :* Geissbuehler ed. Advances in Pesticide Science Part. 2 : 223-234

TREBST A. and HARTH E. (1974) - Herbicidal N-alkylated-ureas and ringclosed N-acylamides as inhibitors of photosystem II. Z. NaturForsch. 29.c : 232-235

TREBST A , HARTH E. and DRABER W. (1970) - On a new inhibitor of photosynthetic electron-transport in isolated chloroplasts. Z. NaturForsch. 25.b (10) : 1157-1159

TREBST A. and HAUSKA G. (1974) - Energy conservation in the photosynthetic membra of chloroplasts. Naturwissenschaften 61 (7) : 308-316

TREBST A. and PISTORIUS E. (1967) - ATP-formation coupled to photosynthetic NADP reduction with artificial electron donors. Biochim. Biophys. Acta 131 : 580-58

TREBST A , PISTORIUS E, BOROSCHEWSKI G. und SCHULZ H. (1968) - Die hemmung photosynthetischen Reaktionen durch Herbicide des Biscarbamat-type. Z. NaturForsch. 23.b (3) : 342-348

a.

TREBST A. and REIMER S. (1973) - Energy conservation in photoreductions by PS II. Reversal of dibromothymoquinone inhibition of Hill-reactions by phenylenediamines. Z. NaturForsch. 28.c (11-12) : 710-716

TREBST A. and REIMER S. (1973)b- Properties of photoreductions by PS II in isolated chloroplasts. III. The effects of uncouplers on phenylenediamine shuttle accross the membrane in the presence of DBMIB. Biochim. Biophys. Acta 325 : 546-557

TREBST A. und WIETOSKA H. (1975) - Hemmung der photosynthetischen Elektronen transports von Chloroplasten durch Metribuzin. Z. NaturForsch. 30.c : 499-504

VAN ASSCHE C.J. (1977) - Communication interne Procida.

VAN ASSCHE C.J. (1979) - Characterization of a common molecular target for selected structures of photosynthesis inhibiting herbicides. *In :* H. Geissbuehler Advances in Pesticides Science Part.3 : 494 - 498 Pergamon Press

VAN ASSCHE C.J. et EBERT J. (1971) - Sur le mode d'action du *p-nitrophényl* ααα *trifluoro-2-nitro-p-tolyléther* sur les végétaux supérieurs. CR. 6ème Conf. COLUMA Tome 1 : 15-31

VAN ASSCHE C.J. and EBERT J. (1976) - Effects of triazine herbicides on the physiology of plants. I. Photosynthesis. *In :* Ebert and Dumford Residue Rev. vol. 65 : 2-96 Springer Verlag Ed.

VAN BEST J.A. and DUYSENS L.N.M. (1975) - Reduction between primary and secondary acceptors of PS II in *Chlorella pyrenoidosa* under anaerobic conditions as studied by chlorophyll *a* fluorescence. Biochim. Biophys. Acta 408 : 154-163

VAN GORKOM H.J. (1974) - Identification of the reduced primary electron acceptor of photosystem II as a bound semiquinone anion. Biochim. Biophys. Acta 347 : 439-442

VAN GORKOM H.J, TAMMINGA J.J. and HAVEMAN J. (1974) - Primary reactions, plastoquinone and fluorescence yield in subchloroplast fragments prepared with deoxycholate. Biochim. Biophys. Acta 347 : 417-438

VAN OVERBEEK J. (1964) - Survey of mechanisms of herbicidal action. *In :*L.J. Audus (ed.) The physiology and biochemistry of herbicides p.387 - Academic Press

VAN RENSEN J.J.S. (1971) - Action of some herbicides in photosynthesis of *Scenedesmus* as studied by their effects on oxygen evolution and cyclic photophosphorylation. Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 71 : 9

VAN RENSEN J.J.S. and KRAMER H.J.M. (1979) - Short-circuit electron transport insensitive to diuron-type herbicides induced by treatment of isolated chloroplasts with trypsin. Plant Sci. Letters 17 : 21-27

VELTHUYS B.R. and AMESZ J. (1974) - Charge accumulation at the reducing side of system 2 of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 333 : 85-94

VELTHUYS B.R. and KOK B. (1978) - Observation on the O_2 evolution system. *In :* Proc. 4th. Int. Congr. Photosynth. (Ed. D.O. Hall, J. Coombs, T.W. Goodwin) 359-372 - London : Biochem. Soc.

VERNON L.P. and AVRON M. (1965) - Photosynthesis. *In :* Ann. Rev. Biochem. 34 : 269-296

VERNON L.P. and ZAUGG W.S. (1960) - Photoreductions by fresh and aged chloroplasts : requirement for ascorbate and *2,6 dichlorophenolindophenol* with aged chloroplasts. J. Biol. Chem. 235 (9) : 2728-2733

VERNOTTE C, ETIENNE A.L. and BRIANTAIS J.M. (1979) - Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool. Biochim. Biophys. Acta 545 : 519-527

VIERKE G. (1978) - Kinetics of deactivation of the charged state formed upon illumination on the oxidizing site of PS II in the presence of DCMU in *Chlorella* after extraction of membrane-bound maganese by NH_2OH. *In :* H. Metzner, Photosynthetic Oxygen evolution 340-345 - Academic Press

WAIN R.L. (1964) - Ioxynil-some considerations on its mode of action. *In :* 7th Brit. Weed Control Conf. vol.1 : 306-311

WAKAMORI S. (1973) - The mode of the herbicidal action of *benzyl N-N-dialkyl-dithiocarbamates*. Agr. Biol. Chem. 37 (2) : 307-312

WALKER D.A. (1965) - Correlation between photosynthetic activity and membrane integrity in isolated pea chloroplasts. Plant Physiol. 40 : 1157-1161

WALSH G.E. (1972) - Effects of herbicides on photosynthesis and growth of marine unicellular algae. Hyacinth Control J. 10 : 45-49

WARBURG O. (1919) - Uber die Geschwindigkeitder photochemischen Kohlensaürezersetzung in lebenden zellen - Biochim. Z : 100 : 230

WARBURG O. and LÜTTGENS W. (1946) - Photochemical reduction of quinone in green cells and granules. Biokhimiya 11 : 303-322 in Chemical Abstracts (1947) vol.41 (1) : 501 e

WESSELS J.S.C. (1959) - Dinitrophenol as a catalyst of photosynthetic phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 36 : 264-265

WESSELS J.S.C. and Van der VEEN R. (1956) -The action of some derivatives of *phenylurethan* and of *3-phenyl 1,1-dimethylurea* on the Hill reaction. Biochim. Biophys. Acta 19 : 548-552

WHATLEY F.R, ALLEN M.B. and ARNON D.I. (1955) - Photosynthetic phosphorylation as an anaerobic process. Biochim. Biophys. Acta 16 : 405-408

WHATLEY F.R. and ARNON D.I. (1962) - Photosynthetic phosphorylation in plants. *In :* S. Colowick and N.O. Kaplan - Methods in Enzymology. vol. VI : 308-313 Academic Press

WINGET G.D, IZAWA S. and GOOD N.E. (1965) - The stoichiometry of photophosphorylation Biochem. Biophys. Res. Comm. 21 (5) : 439-443

WITT K. (1973) - Evidence of X-320 as a primary acceptor of photosystem II in photosynthesis. FEBS Letters 38 (1) : 116-118

WITT H.T. (1976) - On the bioenergetic mechanism in the membrane of photosynthesis. Abstracts 10th Int. Congress of Biochemistry Hamburg : p.312

WITT H.T. (1979) - Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods. The central role of the electric field. Biochim. Biophys. Acta 505 : 355-427

WOLLMAN F.A. (1978) - Determination and modification of the redox state of the secondary acceptor of PS II in the dark. Biochim. Biophys. Acta 503 : 263-273

WOOLMAN F.A. et THOREZ D. (1976) - Oscillation du niveau de fluorescence initiale che *Chlorella pyrenoïdosa* après pré-illumination, puis addition de DCMU. CR. Acad. Sc. Paris t.285 - série D - 1345-1348

YAMASHITA T. and BUTLER W.L. (1968.a) - Photoreduction and photophosphorylation with Tris-washed chloroplasts. Plant Physiol. 43 : 1978-1986

YAMASHITA T. and BUTLER W.L. (1968.b) - Inhibition of chloroplasts by UV-irradiation and heat-treatment. Plant Physiol. 43 : 2037-2040

YAMASHITA T, TSUJI J. and TOMITA G. (1971) - Reactivation of the Hill reaction of Tris-washed chloroplasts. Plant Cell Physiol. 12 : 117-126

ZANKEL K.L. and KOK B. (1972) - in A. San Pietro Ed. Methods in Enzymology. vol. 24 KOLOWICK and KAPLAN - Academic Press N.Y. : p. 218

ZEIDLER A, FISCHER A. und SCHEUERER G. (1969) - Über zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und herbizider Wirkung bei Chinazolin-Derivaten und verwandten heterocyclischen systemen. Z. NaturForsch. 21.B : 740-744

ZWEIG G. and AVRON M. (1965) - Oxidation-reduction potential of the photoproduced reductant of isolated chloroplasts. Biochem. Biophys. Res. Comm. 19 (4) : 397-400

ZWEIG A, HITT J.E. and CHO D.H. (1969) - Mode of action of dipyridyls and certain quinone herbicides. J. Agr. Food Chem. 17 (2) : 176-181

ZWEIG A, TAMAS I. and GREENBERG E. (1963) - The effect of photosynthesis inhibitors on oxygen evolution and fluorescence of illuminated *Chlorella*. Biochim. Biophys. Acta 66 : 196-205